

**DER GLUCOSAMIN → MUCOPOLYSACCHARID-
STOFFWECHSEL IN SPEICHELDRÜSEN
VON DROSOPHILA VIRILIS**

Erich Enghofer

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555626_0027

DER GLUCOSAMIN $\rightarrow$ MUCOPOLYSACCHARID-
STOFFWECHSEL IN SPEICHELDRÜSEN
VON DROSOPHILA VIRILIS

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt
von
Erich Enghofer
aus
Altötting

Juni 1977

1. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Linzen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rüdiger
Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juli 1977



Die vorliegende Arbeit wurde am Zoologischen Institut der Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. B. Linzen und Herrn Dr. H. Kress durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Bernt Linzen sowie Herrn Dr. Horst Kress danke ich herzlich für die Anregung zu dieser Arbeit und für viele fördernde Diskussionen.

Mein Dank gilt auch Frau Maria Brenzinger und Frau Helga Geisert für das Anfertigen der Zeichnungen sowie die Ausführung der Aminosäure-Analysen.

Die Untersuchungen wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 51) unterstützt.

"Denn zur Einsicht in den geringsten Teil
ist die Übersicht des Ganzen nötig."

(Goethe, Geschichte der Farbenlehre 6, 69)

Für M.

Benutzte Abkürzungen:

AcCoA = Acetyl-Coenzym A; F-6-P = Fructose-6-Phosphat; F-1,6-diP = Fructose-1,6-diphosphat; G-6-P = Glucose-6-Phosphat; Glu = Glutamat; Glu-NH₂ = Glutamin; GM = Glucosamin; GM-6-P = Glucosamin-6-Phosphat; H-6-P = Hexose-6-Phosphate (= G-6-P + F-6-P); NAcGM = N-Acetylglucosamin; NAcGM-1-P = N-Acetylglucosamin-1-Phosphat; NAcGM-6-P = N-Acetylglucosamin-6-Phosphat; P_i = anorganisches Phosphat; TEG-Puffer = TRIS+EDTA+GSH-Puffer; UDPGal = UDP-Galactose; UDPG = UDP-Glucose; UDPNacGALM = UDP-N-Acetylglactosamin; UDPNacGM = UDP-N-Acetylglucosamin; UDPNacHM = UDP-N-Acetylhexosamin (= UDPNacGALM + UDPNacGM).

Kurzformen und EC-Nummern der Enzyme:

NAcGM-P-Mutase = N-Acetylglucosamin-Phosphomutase (EC 2.7.5.2); GM-Kinase = Glucosamin-Kinase (EC 2.7.1.8); N-Acetylase = Glucosamin-Phosphat-Acetyltransferase (EC 2.3.1.3); GM-P-Isomerase = Glucosamin-Phosphat-Isomerase, auch Glucosamin-Deaminase genannt (EC 5.3.1.10); Aminotransferase = Glutamin-Fructose-6-Phosphat-Aminotransferase; Pyrophosphorylase = UDP-N-Acetylglucosamin-Pyrophosphorylase (EC 2.7.7.23); UDP-Glucose-4-Epimerase (EC 5.1.3.2); UDP-N-Acetylglucosamin-4-Epimerase (EC 5.1.3.7).

A) Einleitung	1
B) Material und Methoden	
I. Tiere und Tieraufzucht	5
II. Chemikalien, Synthesen	5
III. Enzymtests in vitro	
1) Gewinnung der Extrakte	7
2) Inkubationsansätze	7
3) Quantitative Bestimmung der Metabolite	8
IV. Inkubation explantierter Speicheldrüsen	9
V. Fraktionierung phosphathaltiger Metabolite des Glucosamin-Stoffwechsels	
1) Präparation der Säule	9
2) Vorbereitung der äthanoldenaturierten Proben für die Säule	10
3) Elutionsbedingungen	10
4) Trocknung der Einzelfractionen	11
5) Vorbereitung der Sammelfractionen für die Dünnschichtchromatographie	11
VI. Quantitative Dünnschichtchromatographie	
1) Aufnehmen der Sammelfractionen in 80 % Äthanol	12
2) Quantitative Auftragung und Auswertung der Dünnschichtplatten	12
3) Radioaktivitätsmessung	18
VII. Einbau radioaktiver Vorstufen in Sekretproteine explantierter Speicheldrüsen	19
1) Inkubationsbedingungen	19
2) Polyacrylamid-Gelelektrophorese	19
VIII. Weitere analytische Methoden	
1) Einbau von ^3H -Leucin in explantierte Speichel- drüsen in verschiedenen Kulturmedien	20
2) Automatische Analyse von Aminosäuren bzw. Amino- (Nucleotid-) Zuckern	20
3) Konvertierung von Amino- und Zuckern zu den korres- pondierenden Pentosen	21
C) Ergebnisse	
I. Ausarbeitung einer geeigneten Trennmethode für Glucosamin-Metabolite	22
1) Standardisierung der Elutionsbedingungen	22

2) Chromatographische Hilfsmaßnahmen	27
3) Ausbeutemessungen	29
II. Untersuchung des Glucosamin-Stoffwechsels in Speicheldrüsen in vitro und "in vivo"	
1) Zwei Experimente in vitro zur Prüfung der Methode	32
2) Kinetische und ontogenetische Charakterisie- rung der Synthese von GM-6-P und NAcGM-6-P in vitro	36
a) Kinetische Eigenschaften der an der GM-6-P und NAcGM-6-P-Synthese beteiligten Enzyme	37
b) Ontogenie der GM-P-Isomerase, Aminotrans- ferase und N-Acetylase	45
3) Einbau radioaktiver Vorstufen in Glucosamin- Metabolite in explantierten Speicheldrüsen ..	46
a) Eignung verschiedener Kulturmedien für die Funktionsintegrität der Speicheldrüsen ...	48
b) Experimentelle Strategie	50
c) Methodische Vorarbeiten	
α) Identifizierung der gebildeten Metabolite	51
β) Zeitabhängigkeit des Einbaus von ^3H - Glucose und ^{14}C -Uridin	57
4) Ontogenie der Synthese von Glucosamin- Metaboliten	60
5) Einbau radioaktiver Substrate in Sekret- proteine explantierter Speicheldrüsen	69
D) Diskussion	
I. Die am Glucosamin-Stoffwechsel beteiligten Enzyme	74
II. Quantitative Beziehungen im F-6-P-Umsatz in vitro	80
III. Hormonelle Regulation der Aminotransferase	82
IV. Einbaustudien	83
E) Zusammenfassung	94
Literatur	97

A) EINLEITUNG

Bei Eukaryonten ist die Frage, wie die Synthese von Proteinen genetisch kontrolliert wird, noch weitgehend ungeklärt. Die im Vergleich zu Prokaryonten hohe Komplexität von Aufbau und Funktion der Zellen erschwert diesbezügliche Untersuchungen. Erfolge erzielte man bisher nur bei solchen Zellsystemen oder Organen, deren Funktion die Synthese eines einzigen oder weniger Proteine ist, z.B. des Hämoglobins in Erythroblasten, der Crystalline in Augenlinsen, des Ovalbumins im Hühnerovidukt oder Vitellogenins in der Leber eierlegender Tiere.

In all diesen spezialisierten Zelltypen wird die Proteinsynthese mit Hilfe langlebiger m-RNA durchgeführt (1-4). Diese liegt in einigen Fällen in "maskierter" Form vor (5) und wird erst unter dem Einfluß bestimmter Faktoren - z.B. einer die Translation kontrollierenden RNA wie im embryonalen Hühnermuskel (6) - zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt aktiviert und damit translatiert (7-10). Im Laufe der Entwicklung setzt deswegen die Synthese bestimmter Proteine nicht unbedingt die gleichzeitige Aktivität der sie codierenden Gene voraus.

In der Tat gibt es Hinweise, daß bei der Synthese bestimmter Proteine die Bildung der m-RNA mehr oder weniger lange vorher (30 min bis 36 h) stattfindet (11). Obwohl jene Untersuchungen mit Hilfe von Inhibitoren der RNA-Synthese durchgeführt wurden, und demzufolge als indirekt zu betrachten sind, zeigen sie doch, daß bestimmte Entwicklungsvorgänge sich wahrscheinlich nur dann verstehen lassen werden, wenn eine mögliche zeitliche Verschiebung zwischen dem Transkriptionsgeschehen und dem Auftreten korrespondierender Proteine einkalkuliert wird. Bei den erwähnten Untersuchungsobjekten ist eine Bestätigung dieser Annahme nur mit großem experimentellen Aufwand möglich, z.B. durch Isolierung spezifischer m-RNA, da die Transkription der Gene selbst

wegen ihrer geringen "Konzentration" in der Zelle nicht zu beobachten ist.

Unter diesen Gesichtspunkten bieten sich die Riesenchromosomen der larvalen Speicheldrüsen von Dipteren für das Studium der Regulation der Transkription in einem höheren Organismus als erfolgversprechendes Objekt an. Diese zeigen mikroskopisch sichtbare, reversible Strukturmodifikationen, die zu verschiedenen Entwicklungszeiten an verschiedenen Chromosomenorten auftreten, und als "Puffs" bezeichnet werden. Sowohl der Einbau von ^3H -Uridin (12) als auch die spezifische Färbung auf RNA (12-16) zeigen, daß in gepufften Querscheiben intensiv RNA synthetisiert wird, so daß das Auftreten von Puffs zurecht als sichtbarer Ausdruck transkriptiver Aktivität gedeutet wird (17).

In Untersuchungen an *Acricotopus* (18) und *Chironomus* (19-21) wurden Beziehungen zwischen der Aktivität gepuffter Chromosomenorte und der Synthese zellspezifischer Proteine festgestellt. Mit Chromosomenmutanten wurde bei *Drosophila melanogaster* die Aktivität eines Puffs im X-Chromosom der Synthese eines Sekretproteins zugeordnet (22, 23).

In den genannten Fällen handelt es sich um Sekretproteine mit komplexem Aufbau. Bei *Drosophila* enthalten die Sekretproteine der Speicheldrüsen Aminosäcker (24-26), und es ist zu erwarten, daß der Stoffwechsel dieser Zucker in Zusammenhang mit der Sekretsynthese reguliert wird. Ein Hinweis, daß die Regulation auf der Transkriptionsebene erfolgt, ist der Befund, daß durch Injektion von Glucosamin in die larvale Hämolymphe von *D. virilis* ein bestimmter Puff (55L im III. Chromosom) signifikant reprimiert wird (27). Die Möglichkeit, daß bei Eukaryonten ein Metabolit einen direkten, wenigstens so kurzzeitigen Effekt auf das Genom hat, war vorher noch nicht beobachtet worden.

Nachfolgende Untersuchungen ergaben, daß das erste

Enzym der Mucopolysaccharidsynthese, die Glutamin-Fructose-6-Phosphat-Aminotransferase, welches die Bildung von Glucosamin-6-Phosphat aus Fructose-6-Phosphat und Glutamin katalysiert, in den Speicheldrüsen genau im Zeitraum der Sekretsynthese aktiv ist und in vitro den gleichen Aktivitätsverlauf zeigt, wie die in vivo bestimmte "Puffaktivität" von 55E (27, 28, 29).

Allerdings zeigen in vitro-Messungen immer nur die Maximalkapazität eines Enzymsystems an; die Aktivität in vivo könnte möglicherweise ganz anders verlaufen. In vitro sind die Inkubationsbedingungen hinsichtlich des pH-Werts, der Substratkonzentrationen und des Ionenmilieus optimiert. Ferner ist bekannt, daß die Amino-transferase in *D. virilis* einer Feedback-Hemmung durch UDP-N-Acetylglucosamin und wahrscheinlich auch einer Substrathemmung durch Glutamin unterliegt (28). Wollte man die Aktivität des Enzyms in vivo aus den in vitro-Daten ableiten, müßte man alle genannten Parameter in vivo quantifizieren; dann bestünde aber immer noch die Möglichkeit, daß weitere, bisher unbekannte Faktoren in vivo eine Rolle spielen. Alternativ könnte man versuchen, die Aktivität in vivo durch Injektion markierter Substanzen in die Tiere, oder durch Inkubation explantierter Drüsen unmittelbar zu messen.

Aus diesen Punkten ergab sich als Aufgabe der vorliegenden Arbeit die Untersuchung des Glucosamin-Stoffwechsels an explantierten Speicheldrüsen in einem Kulturmedium. Als Objekt dienten Larven von *D. virilis*. Diese können bei dieser Art im späten III. Larvenstadium relativ leicht synchronisiert werden (30). Unter den gewählten Aufzuchtbedingungen verlassen die Tiere 140 h nach Eiablage das Futter, um sich 11.2 h später zu verpuppen. Die Versuche erstreckten sich über dieses 11-Stunden-Intervall und die folgenden 10 h nach Pupariumbildung, da in diesen Zeitraum das Ende der Synthe-

se larvalen Sekrets fällt und damit vom Standpunkt der Regulation aus besonders interessant erschien.

Die vorgesehenen Untersuchungen machten wegen der geringen Menge an Ausgangsmaterial (2-4 mg frisches Drüsengewebe) die Erarbeitung bzw. die Anpassung bereits bekannter Mikromethoden an die gestellten Aufgaben erforderlich. Aus diesem Grund gliedert sich die Darstellung der Resultate in zwei Teile: Im ersten Teil wird der Schwerpunkt auf die Ausarbeitung von Methoden gelegt, mit deren Hilfe dann an die im zweiten Teil beschriebenen biologischen Fragestellungen herangegangen werden konnte.

B) MATERIAL UND METHODEN

I) Tiere und Tieraufzucht

Die Untersuchungen wurden an Larven eines *Drosophila virilis*-Wildstammes aus dem Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen, durchgeführt. Die Tiere wurden bei 25.4 °C in einem Standardmedium aufgezogen. Die genaue Altersbestimmung erfolgte nach Angaben von Kress (30). Die Speicheldrüsen wurden auf einem gekühlten Präpariertisch unter dem Binokular aus den Tieren explantiert und von Fettkörper sorgfältig freipräpariert.

II) Chemikalien, Synthesen

Die nicht-radioaktiven Chemikalien und Metabolite waren von p.a. Qualität.

N-Acetylglucosamin-6-Phosphorsäure (NacGM-6-P) wurde aus Glucosamin-6-Phosphat (GM-6-P) nach der Acetanhydridmethode von Distler et al. (31) hergestellt. Das Reaktionsgemisch wurde in Abänderung der ursprünglichen Methode über eine DOWEX 1-Säule, HCOO^- -Form (5x50 mm) chromatographiert (Herstellung der Säule siehe V, 1), wobei durch Elution mit 0.005 N HCOOH Spuren von GM-6-P abgetrennt wurden, bevor NacGM-6-P mit 4 N HCOOH eluiert, und das Eluat lyophilisiert wurde.

N-Acetylglucosamin-1-Phosphorsäure (NacGM-1-P) wurde enzymatisch aus UDP-N-Acetylglucosamin (UDPNacGM) mittels Phosphodiesterase (*Crotalus adamanteus* venom, Typ II; Sigma) freigesetzt. Das Enzym spaltet UDP-N-Acetylhexosamine (UDPNacHM) in UMP und NacHexosamin-1-P. Die Inkubation wurde in Natriumbarbituratpuffer (pH 8.8) bei 37 °C ausgeführt (32) und nach 45 min durch 3-minütiges Erhitzen auf 95 °C gestoppt. Das Reaktionsgemisch wurde zuerst über DOWEX 50, H^+ -Form (5x50 mm) chromatographiert, um das Na-Salz zur freien NacGM-1-Phosphorsäure zu konvertieren. Anschließend wurde über DOWEX 1,

HCOO⁻-Form (5x50 mm) das Begleitprodukt UMP abgetrennt, wobei die Elution wie für NAcGM-6-P mit 4 N HCOOH erfolgte, einer Konzentration, bei der UMP an die Säule gebunden blieb. Das Eluat wurde lyophilisiert.

Die radioaktiv markierten Chemikalien wurden von der Firma Amersham Buchler, Braunschweig, bezogen. Das dort erhältliche U-¹⁴C-Fructose-6-Phosphat (¹⁴C-F-6-P) war bis zu 50 % mit ¹⁴C-GM-6-P verunreinigt (Abb. 1), so daß es vor seiner Verwendung gereinigt werden mußte.

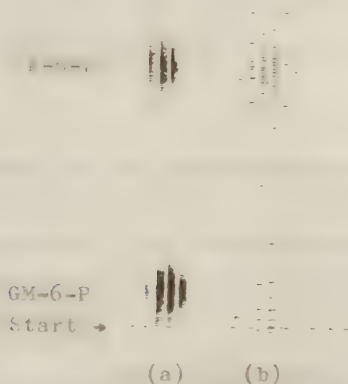


Abb. 1

Reinheitsprüfung einer unbehandelten (a) und einer im Batch-Verfahren mit DOWEX 1, HCOO⁻-Form gereinigten (b) Charge von U-¹⁴C-F-6-P (Firma Amersham/Buchler). Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte im System B (Tab. 1). Lokalisation der Radioaktivität mit dem Berthold-Scanner mit Punktdrucker.

Dies geschah im Batch-Verfahren mit 1 ml DOWEX 1, HCOO⁻-Form, wobei stufenweise mit jeweils 5 ml H₂O, 0.005 N und 3.5 N HCOOH Verunreinigungen ausgewaschen wurden, während U-¹⁴C-F-6-P mit 5 N HCOOH eluiert wurde. Die Ameisensäure wurde durch drei Extraktionen mit Äthyl-Äther ausgeschüttelt, und die wäßrige Phase (pH 5-6) gefriergetrocknet.

In einigen Fällen wurde U-¹⁴C-F-6-P enzymatisch aus U-¹⁴C-Fructose und ATP synthetisiert (33). Die Isolierung des Reaktionsproduktes erfolgte im Batch-Verfahren, wie oben beschrieben.

U-¹⁴C-F-6-P erwies sich nach Ionenaustausch- und Dünnschichtchromatographie zum Zeitpunkt der Experimente zu mindestens 97 %, alle übrigen radioaktiven Substanzen wenigstens zu 98 % als rein.

III. Enzymtests in vitro

1) Gewinnung der Extrakte

Zur Bestimmung der Aktivität der am Glucosamin-Stoffwechsel beteiligten Enzyme in vitro wurden meist 20 Drüsenpaare in TEGS-Puffer (50 mM TRIS, 4 mM EDTA, 5 mM GSH, 16 mM Sucrose; mit HCl auf pH 7.1 eingestellt) unter Eiskühlung präpariert und in 10 µl TEGS-Puffer gesammelt. Die Drüsen wurden nach Zugabe weiterer 50 µl TEG-Puffer in 0.4 ml-Zentrifugenröhrchen homogenisiert, das Volumen mit TEG-Puffer anschließend auf 210 µl ergänzt, und 15 min bei 15.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde für die jeweiligen Enzymtests verwendet.

2) Inkubationsansätze

Die Inkubation wurde gestartet durch Einpipettieren von 100 (50) µl des 15.000 g-Überstandes in 400 (200) µl TEG-Puffer, in dem die Substrate bzw. Inhibitoren oder Effektoren gelöst waren. Die Standardansätze für die jeweiligen Enzyme waren:

a) Glutamin-Fructose-6-Phosphat-Aminotransferase:
20 mM F-6-P, 3 mM Glutamin (Glu-NH₂); pH 6.82.

b) Glucosamin-Phosphat-Isomerase:
20 mM F-6-P, 20 mM NH₄Cl, 20 mM Glucose-6-Phosphat (G-6-P); pH 7.4.

c) Glucosamin-Phosphat-Acetyltransferase:
23 mM GM-6-P, 1 mM Acetylcoenzym A (AcCoA); pH 6.6.

Kontrollansätze enthielten, wenn nicht anders angegeben, keine Substrate, wurden aber unter sonst gleichen Bedingungen inkubiert. Die Inkubation wurde bei 39 °C ausgeführt. Unmittelbar nach dem Start und 45 min später wurden ein- oder zweimal 100 µl-Proben entnommen, in denen die Reaktion durch 3-minütiges Erhitzen auf 95 °C gestoppt wurde.

3) Quantitative Bestimmung der Metabolite (Farbreaktionen)

GM-6-P wurde nach einer den geringen Substanzmengen angepaßten Modifikation des Elson-Morgan-Tests (34, 35) bestimmt: Zu 100 µl-Probenlösung (5-50 Nanomole GM-6-P) wurden 20 µl Acetanhydridlösung (1.5 % Acetanhydrid v/v in Aceton) und 100 µl Boratpuffer (1.12 M Borsäure und 0.56 M KOH; pH 9.2) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 8 min bei 95 °C temperiert und anschließend auf 0 °C gekühlt. Unter Eiskühlung wurden 750 µl para-Dimethyl-amino-Benzaldehyd (DMAB)-Reagens (9 g DMAB in 100 ml Eisessig, der 12.5 % (v/v) konzentrierte HCl enthielt), sowie 50 µl Äthylcellosolve pipettiert. Die Proben wurden auf 20-21 °C temperiert und nach genau 15 min wurde die Extinktion bei 576 nm in einem Eppendorf-Photometer gemessen.

NAcGM und NAcGM-6-P wurden nach derselben Methode bestimmt, nur wurde statt der Acetanhydridlösung reines Aceton verwendet. GM-6-P konnte bei gleichzeitiger Anwesenheit von NAcGM bzw. NAcGM-6-P quantifiziert werden, wenn in einem Parallelansatz NAcGM bzw. NAcGM-6-P bestimmt wurde.

NAcGM-1-P, das im Elson-Morgan-Test nicht erfaßt wird (36), wurde nach Hydrolyse mit 0.1 N HCl für 10 min bei 100 °C als NAcGM bestimmt.

G-6-P und F-6-P wurden enzymatisch mit Hilfe des optischen Tests bestimmt (33).

Als Standards dienten in TEG-Puffer gelöstes GM-6-P, NAcGM, NAcGM-6-P, sowie G-6-P und F-6-P.

IV. Inkubation explantierter Speicheldrüsen

Das Medium, in dem isolierte ganze Speicheldrüsen inkubiert wurden, wich in folgenden Punkten von der Originalangabe (37) ab: Es enthielt

- a) anstelle von Glucose eine äquimolare Menge Mannose,
- b) Streptomycin-Sulfat und Penicillin G, je 100 µg/ml, und war auf pH 6.82 eingestellt.

Für die Inkubationen wurden meist 20 Drüsenpaare im Medium unter Eiskühlung präpariert und in 10 µl Medium gesammelt. Die Inkubation, die in 0.8 ml-Mikrohomogenisatoren (Contes) erfolgte, wurde durch Zugabe von 50 µl Medium gestartet, in dem die radioaktiven Substrate (^3H -Glucose und ^{14}C -Uridin bzw. ^{14}C -Glucosamin) gelöst waren. Inkubiert wurde unter Schütteln für 1 h bei 26 °C (± 0.5 °C). Die Inkubation wurde beendet durch Tiefgefrieren der Proben (in einem Trockeneis-Methanol-Gemisch) und - noch unter Eiskühlung - durch Pipettieren von 50 µl 100 % Äthanol. Nach der Homogenisation bei 4 °C wurde das Volumen mit 100 % Äthanol bis zur 80 %igen Konzentration des Alkohols aufgefüllt, und das Homogenat 1 min bei 95 °C erhitzt. Nach 5 min Zentrifugation in einer Eppendorf-Zentrifuge folgten drei Extraktionen mit 80 % Äthanol, wobei vor jeder Zentrifugation 1 min bei 95 °C erhitzt wurde. Die vereinigten Überstände wurden im Exsikkator verdampft und bis zu ihrer chromatographischen Trennung bei -20 °C eingefroren.

Nullwerte des radioaktiven Einbaus wurden erhalten, indem die Inkubation sofort nach Zugabe der radioaktiven Substrate durch Tiefgefrieren gestoppt wurde. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie beschrieben.

V. Fraktionierung phosphathaltiger Metabolite des Glucosamin-Stoffwechsels

1) Präparation der Säule

Für die Trennung phosphathaltiger Metabolite wurde die Anionenaustausch-Chromatographie gewählt (38-41).

DOWEX 1x8 (Cl^- -Form), 200-400 mesh (Serva) wurde mittels 4 N NH_4^+ -Formiat in die Formiatform gebracht. Dazu wurde das Harz mit NH_4^+ -Formiat aufgeschlämmt (6-8 l für 100 g Harz), bis der Überstand chloridfrei war. Danach wurde der Austauscher wiederholt in 60 % Ameisensäure suspendiert. Mit H_2O (bidest) wurde die freie Ameisensäure bis zu einem pH von 4.25-4.50 ausgewaschen (mindestens 30 l H_2O für 100 g). In dieser Form wurde das Harz in einem Vorratsgefäß bei 4 °C aufbewahrt.

2) Vorbereitung der äthanoldenaturierten Proben für die Säule

Der äthanoldenaturierte Drüsenextrakt wurde vor der Trennung an einer DOWEX 1-Säule (HCOO^- -Form) in 1 ml H_2O (bidest) aufgenommen, in dem die Carriersubstanzen G-6-P, F-6-P, GM-6-P, NAcGM-6-P, UDPNacGM, UDPGlucose (UDPG), UDPGalactose (UDPGal), sowie UMP, UDP und UTP in Konzentrationen bis 40 $\mu\text{g/ml}$ gelöst waren.

3) Elutionsbedingungen

Die Säule (2x600 mm) wurde für jede Chromatographie aus dem Austauschervorrat neu gepackt. Vor Beginn jeder Trennung wurde die Säule so lange mit H_2O (bidest) durchgespült, bis die austretende Flüssigkeit einen pH-Wert von mindestens 4.25 angenommen hatte. Das zu trennende Gemisch (der deproteinisierte Drüsenextrakt mit den Carriersubstanzen) wurde auf die bei 25.5 °C temperierte Säule aufgetragen und mit H_2O (bidest) - etwa 12 ml - eingewaschen. Die einzelnen Metabolite wurden nun mit einem Stufengradienten aus Ameisensäure und Ammoniumformiat eluiert (Konzentrationsangaben siehe Abb. 5). Die Durchflußrate (6.2 ml/h) wurde mittels einer Infusionspumpe (Braun, Melsungen) reguliert.

Die Extinktion des Eluats bei 260 nm wurde mit einem Hitachi-Photometer mit Durchflußküvette gemessen und von einem Schreiber (Servogor) registriert, während das Eluat in Fraktionen zu 20 Tropfen aufgefangen wurde.

4) Trocknung der Einzelfractionen

Nach der Säulenelution wurden die in Eppendorf-Ge-fäßen gesammelten Fraktionen im Exsikkator unter einer Infrarotlampe getrocknet. Das Eindampfen von Proben, die Ammoniumformiat enthielten, geschah in einem Ex-sikkator, der mit einer Silicagel-enthaltenden Kälte-falle, die mit Trockeneis-Methanol gekühlt wurde, ver-bunden war. Auf diese Weise wurde eine vollständige Trocknung der Proben erreicht, wenn auch Rückstände von Ammoniumformiat blieben.

5) Vorbereitung der Sammelfractionen für die Dünnschicht-chromatographie

Die getrockneten Fraktionen wurden in 200 μ l H_2O aufgenommen. 100 μ l davon dienten als Kontrolle, und wurden entweder zur colorimetrischen Bestimmung der Positionen von GM-6-P, NAcGM-1-P, NAcGM-6-P, G-6-P bzw. F-6-P verwendet, oder - da die Lage der Gipfelfraktio-nen von Versuch zu Versuch konstant war, und nur etwa bei jedem 10. Trennexperiment überprüft wurde - zur Radioaktivitätsmessung der Einzelfractionen. Die Lage der Uridinderivate ging aus der laufenden Extinktions-aufzeichnung des Säuleneluats bei 260 nm hervor.

Für die nachfolgende Dünnschichtchromatographie wurden von den jeweiligen Gipfelfractionen (Abb. 2) die verbliebenen 100 μ l zu einer Sammelfraction ver-einigt, und das Lösungsmittel verdampft. Je nach An-bzw. Abwesenheit von Ammoniumformiat wurde getrennt verfahren: Während die GM-6-P- und die NAcGM-Phosphat-Sammelfractionen im Exsikkator getrocknet wurden, mußte bei allen übrigen erst der die Dünnschichtchro-matographie störende Rückstand an Ammoniumformiat be-seitigt werden. Dazu wurden diese Fraktionen über DOWEX 50x8 H^+ -Form, 200-400 mesh chromatographiert, um das Salz zu $HCOOH$ zu konvertieren. Die Länge der Säulen ($\varnothing$ 5 mm) richtete sich dabei nach der Menge an NH_4^+ , die in der jeweiligen Sammelfraction enthalten war,

und wurde der Kapazität des Harzes (1.7 meq/ml Harz; z.B. 50 mm bei 0.12 N HCOONH_4) entsprechend gewählt. Die Proben wurden vor dem Aufbringen auf die Säule mit 1 N NaOH auf pH 6-7 eingestellt, in die Säule eingespült, und anschließend mit H_2O (bidest) in einen Schliffkolben eluiert. Bei 1 Torr und einer vorgelegten Methanol-Trockeneis-Falle wurden die Proben zum Schluß unter einer Infrarotlampe lyophilisiert.

VI. Quantitative Dünnschichtchromatographie

1) Aufnahmen der Sammelfractionen in 80 % Äthanol

Die Sammelfractionen wurden zur weiteren Reinigung bzw. Auftrennung in Einzelkomponenten auf Dünnschichtplatten chromatographiert. Sie wurden in 100-150 μl 80 %igen Äthanol aufgenommen. Hierbei erübrigte sich meistens die erneute Zugabe von Carriersubstanzen.

2) Quantitative Auftragung und Auswertung der Dünnschichtplatten

In Zusammenarbeit mit der Institutswerkstatt wurden zwei automatische Auftragungsgeräte gebaut (Abb. 2). Diese waren so konstruiert, daß im Verlaufe von 1/4 bis 2 min (stufenlos einstellbar) aus einer 25 μl -Hamilton-Mikroliterspritze jeweils 1/2 μl auf eine Dünnschichtplatte pipettiert wurde. Während des Auftragens wurde die Platte aus einem Abstand von 5-10 cm heiß geföhnt. Mit dieser Auftragsart wurden, unabhängig vom Dünnschichtmaterial, über sämtliche Versuchsserien hinweg Flecken gleicher Größe erzeugt.

Die Chromatographie der Metabolite erfolgte nach den in Tab. 1 angegebenen dünnschichtchromatographischen Verfahren. Die Uridinderivate wurden unter kurzwelligem UV-Licht (254 nm) auf Dünnschichtplatten mit Fluoreszenzindikator identifiziert und markiert. Erfolgte der Substanznachweis mit Hilfe einer Farbreaktion, wurde mit sog. "Leitchromatogrammen" (42) gearbeitet. Es wurden dazu mindestens zwei identische

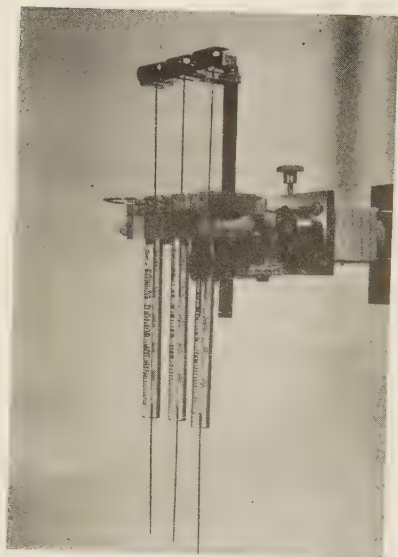
Abb. 2

Obere Bilder: Apparatur 1 (a), bei der ein elektrisch angetriebener Exzenter (Bild b, Mitte) auf den Auslöseknopf der Hamilton-Dosiervorrichtung wirkt. Durch einen Adapter (oben in a) werden gleichzeitig 3 Spritzen gesteuert. Die Umdrehungsgeschwindigkeit des Miniaturmotors (durch ein Getriebe untersetzt) wird durch ein Potentiometer stufenlos reguliert.

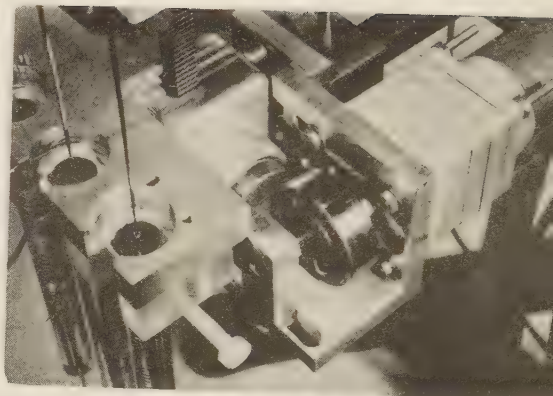
Untere Bilder: Apparatur 2. Es werden gleichzeitig 3 Hamilton-Spritzen gesteuert (Bild c). Der Vorschub erfolgt über eine Steuerscheibe, deren Rand genau einen Umgang eines Gewindes aufweist (d). Das Gewinde greift in eine Zahnstange ein.

Abb. 2

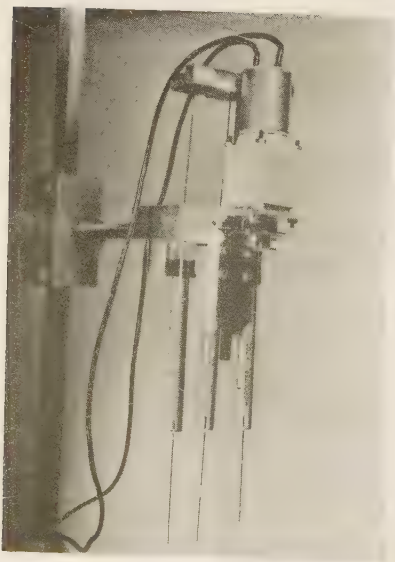
(a)



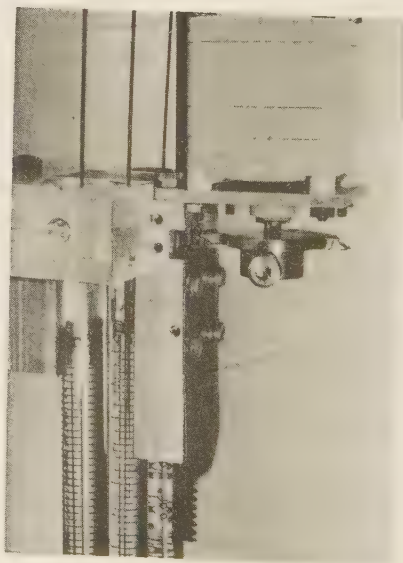
(b)



(c)



(d)



Tab. 1

Zusammenstellung der dünnschichtchromatographischen
Systeme zur Trennung oder Nachreinigung der Metabolite

Substanzen	System*	R _f	Ausbeute(%)	Nachweis
UDPHexose/ UDPNacHexosamin	A _I	0.22	97	UV ₂₅₄
		0.34	98	
UDPGal/ UDPG	A _{II}	0.18	96	UV ₂₅₄
		0.32	99	
UDPNacGALM/ UDPNacGM	A _{II}	0.32	--**	UV ₂₅₄
		0.43	99	
UMP	A _I	0.47	98	UV ₂₅₄
	A _{II}	0.15	97	
UDP	A _I	0.07	96	UV ₂₅₄
UTP	A _I	0.03	96	UV ₂₅₄
G-6-P/ F-6-P	B	0.22	96	Hanes-Isherwood- Reagens (45)
		0.42	97	
GM-6-P	B	0.08	--	Ninhydrin; 6 min bei 90°C
	C	0.82	96	
	D	0.17	98	
Glucosamin	C	0.36	--	Ninhydrin; s.o.
	D	0.33	--	
NAcGM-1-P/ NAcGM-6-P	E	0.34	98	Hanes-Isherwood- Reagens (45)
		0.42	98	
Xylose/ Arabinose	F	0.61	--	Anilinphthalat; 7 min bei 110 °C
		0.54	--	

Legende zu Tab. 1

* Die ergänzenden Daten zu den Chromatographiesystemen sind in folgender Reihenfolge angeordnet:
Laufmittel; Sorptionsschicht; Literaturstelle

A_I: 1 N Essigsäure - 3 N LiCl (9:1, v/v); PEI-Cellulose,
UV₂₅₄ (Macherey und Nagel); (46)

A_{II}: 6 g Na₂B₄O₇ · 10 H₂O, 3 g H₃BO₃, und, in Abänderung,
25 ml Äthylenglycoll in 45 ml H₂O; sonstige Angaben
wie bei A_I

B: Aceton - Acetonitril - 1 N HCl (64:26:10, v/v);
Cellulose (Merck); (47). In Abänderung wurde zwei-
mal in der I. Dimension entwickelt.

C: 18.2 g Citronensäure - 10.4 g NaOH - 4.7 ml HCl (konz) -
mit H₂O (bidest) ad 1 l; Ionex 25-SA-Na⁺ (Macherey und
Nagel); (48). Die Verwendung einer Keilstreifenschablone
(49) verkürzt die Laufzeit von 4 auf 2.5 h und steigert
den R_f-Wert für GM-6-P von 0.73 auf 0.82.

D: 1-Propanol - NH₄OH (1:1, v/v); Silica Gel G (Merck); (50)

E: Äthanol - 1 M Ammoniumacetat, pH 3.8 (5:2, v/v);
Cellulose₅₀₀ (Macherey und Nagel); (43)

F: t-Butanol - Methyläthylketon - HCOOH - H₂O (8:6:3:3);
Cellulose₅₀₀ (Macherey und Nagel); (51). Zweimal Ent-
wicklung in der I. Dimension.

** Wiederfindungsrate konnte nicht bestimmt werden, da
Standardsubstanz kommerziell nicht erhältlich.

Substanzproben nebeneinander aufgetragen, von denen die eine nach erfolgter Chromatographie mit einem Farbreagens besprüht wurde, während die andere abgedeckt war. In Höhe der erscheinenden Farbflecke wurde auf der vorher abgedeckten Chromatographiebahn eine entsprechende Sorptionsmittelfläche markiert.

Mit Hilfe des Berthold-Scanners und mit Autoradiographien (Kodak X-Omat, XR-5-Film, Expositionszeiten wie angegeben) wurde anschließend geprüft, ob die optisch nachgewiesenen Substanzflecke sich mit radioaktiver Markierung deckten.

Zur Übertragung der Substanzflecken in Zählgläser bzw. Eppendorfgefäße wurden die Dünnschichtplatten mit der Sorptionsschicht nach unten fixiert. Mit einem selbstgebaute Schaber wurde die Substanz in ein Zählglas bzw. Eppendorfgefäß gekratzt (Abb. 3).

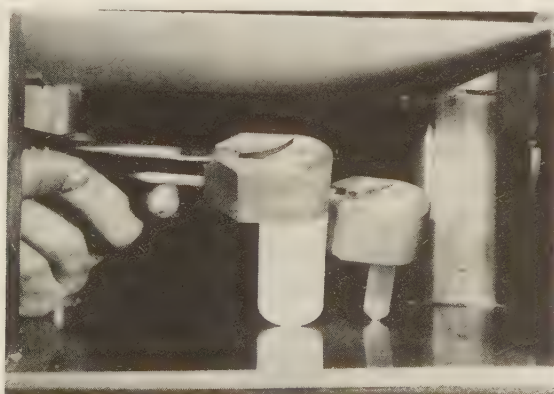


Abb. 3

Hilfsgeräte, mit denen Sorptionsmittel von einer Dünnschichtplatte abgekratzt werden kann. In einen der beiden Schaber ist ein Szintillationsfläschchen eingeschraubt, in den zweiten ein 2 ml-Eppendorfgefäß eingespannt. Oben eine mit der beschichteten Seite nach unten eingehängte Dünnschichtplatte.

Für die colorimetrische Bestimmung wurden die Proben in den Eppendorffgefäßen mit heißem Äthanol (80 %, v/v) versetzt. Es wurde 3-mal mit 80 % Äthanol extrahiert. Die vereinigten Überstände wurden im Exsikkator getrocknet und in H_2O aufgenommen.

3) Radioaktivitätsmessung

Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden die zu messenden Proben in den Zählgläsern mit 500 μl H_2O extrahiert und dann in 10 ml Szintillationslösung (Toluol Triton X 100, 4:1, v/v) gezählt (43). Das Toluol enthielt 0.4 % (w/v) PPO und 0.01 % POPOP. Alle Messungen wurden in einem Mark II Szintillationspektrometer (Nuclear Chicago) durchgeführt. Die Zähl- ausbeute wurde mit der Kanalverhältnismethode oder mit internen Standards von Toluol- 3H bzw. - ^{14}C bestimmt und betrug 32-34 % für 3H -markierte und 78-80 % für ^{14}C -markierte Proben. Auswertung und Korrektur dop- pelmarkierter ($^3H/^{14}C$) Proben erfolgten nach der "Internen Standard Methode" (44). Die Zähl- ausbeuten hierfür waren 32 % für das 3H - und 63-65 % für das ^{14}C -Nuklid.

Quench-Korrekturen waren selbst für solche Proben unnötig, die Sorptionsmittelrückstände enthielten (Tab. 2).

Tab. 2

Vergleich der Radioaktivitätsmessungen und Quench-Zahlen in Proben mit bzw. ohne Sorptionsmittelrückständen.

10 μl 3H -Toluol-Standard (2.5×10^6 dpm/ml) + 500 μl H_2O wurden bei An- bzw. Abwesenheit von Sorptionsmittel ge- zählt. Die cm^2 -Angaben beziehen sich auf die Größe der abgekratzten Sorptionsmittelfläche (siehe Text).

	reine	S o r p t i o n s m i t t e l		
	Flüssigkeitsprb.	Cellulose	PEI-Cellulose	Silicagel
Radioaktivitäts- messung (Ipm)	8694	8741 / 8625	8586 / 8640	8703 / 8616
Quench-Zahl ($1cm^2/2cm^2$)	2.962	2.972/2.949	2.943/2.946	2.930/2.950

VII. Einbau radioaktiver Vorstufen in Sekretproteine explantierter Speicheldrüsen

1) Inkubationsbedingungen

Es wurden zwischen 3 und 10 Speicheldrüsenpaare im modifizierten Poels-Medium präpariert. Die Inkubation wurde mit dem Einlegen der Drüsen in 50 μ l Poels-Medium, das die radioaktiven Vorstufen enthielt und in eine Tüpfelplatte pipettiert worden war, begonnen. Inkubiert wurde bei 26 °C ($\pm$ 0.5 °C) für 1 h, wobei ein Deckglas den Inkubationsraum abschloß. Dann wurden die Drüsen aus dem Medium entfernt und 3-mal in nicht-markiertem Poels-Medium gewaschen, bevor sie in Äthanol/Eisessig (3:1, v/v) fixiert wurden. Nach dem Einbringen der Drüsen in Mikro-Eppendorfgefäße wurde das Fixiermittel verdampft, und das Material bei -20 °C eingefroren.

2) Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Drüsen- und Sekretproteine wurden reduziert und alkyliert (22). Anschließend wurden sie durch Plattingele in einem Acrylamidgradienten (3.8-5.2 %) aufgetrennt. Die Gele (Abmessung: 12.5 x 11.5 x 0.15 cm) wurden nach einer Methode von Grossbach (20), die etwas abgewandelt war, hergestellt, und die Elektrophorese mit 8 mA bei 4 °C für 5 h ausgeführt.

Nach der Trennung wurden die Gele mit 0.25 % Coomassie Brilliant Blue in 7 % Essigsäure gefärbt und in 10 % Methanol + 7 % Essigsäure entfärbt (22). Der autoradiographische Nachweis ^{14}C -markierter Proteine erfolgte mit einem Kodak X-Omat, XR-5-Film. Die Expositionszeiten waren wie angegeben.

VIII. Weitere analytische Methoden

1) Einbau von ^3H -Leucin in explantierte Speicheldrüsen in verschiedenen Kulturmedien

10 Drüsenpaare wurden in dem zu untersuchenden Inkubationsmedium präpariert, und die Drüsen anschließend in 75 μl desselben Mediums unter Schütteln bei 26 °C (± 0.5 °C) inkubiert. Das Ende der Präparation wurde als Zeitpunkt 0 des nachfolgenden Inkubationszeitraums festgelegt. Nach unterschiedlichen Zeitintervallen der Inkubation (später genannt: Vorinkubation) wurde ^3H -Leucin zupipettiert, und 1 1/2 h unter den genannten Bedingungen weiterinkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurde der radioaktive Überstand abpipettiert, während das Drüsengewebe nach Versetzen mit 100 μl leucinfreiem Medium homogenisiert wurde. Zu dem Homogenat wurde TCA bis zu einer Endkonzentration von 10 % gegeben.

Das Homogenat wurde 10 min mit 15.000 g zentrifugiert, das Sediment 3-mal mit 5 % TCA, und 2-mal mit Äthanol/Äther (1:1, v/v) extrahiert, getrocknet und in 300 μl 1 N NaOH gelöst. 200 μl dieser Lösung wurden mit 300 μl H_2O versetzt, bevor 10 ml Szintillationslösung zugegeben wurden.

In einem Kontrollexperiment wurde zum Zeitpunkt 0 bei Eiskühlung das radioaktive Medium zugegeben, abpipettiert und das Drüsensediment homogenisiert und, wie oben, weiterbehandelt. Die in diesem TCA-Extrakt vorhandene Radioaktivität wurde von den Einbauwerten ins Protein abgezogen.

2) Automatische Analyse von Aminosäuren bzw. Amino- (Nucleotid-) Zuckern

Zur Bestimmung der Spiegel freier Aminosäuren und Amino- (Nucleotid-) Zuckern wurden 10 Drüsenpaare in TEGS-Puffer präpariert und in 0.4 ml-Zentrifugen-

röhrchen in 10 μ l desselben Puffers gesammelt. Nach Zugabe von 50 μ l 80 %igen Äthanol wurde bei 4 °C homogenisiert und das Homogenat durch Zupipettieren von absolutem Äthanol auf 50 % Endkonzentration des Alkohols gebracht. Es folgten drei Extraktionen mit 80 % Äthanol, wobei zwischen den Extraktionsschritten 1 min bei 95 °C erhitzt und 5 min bei 15.000 g zentrifugiert wurde. Die vereinigten Überstände wurden zur Trockene gebracht und bis zur Analyse bei -20 °C tiefgefroren.

Die automatische Analyse wurde mit dem Mikro-Aminosäure-Analysator "Chromatocord" (Labotron) durchgeführt. Die Versuchsbedingungen waren: pH 3.07, 5.23 und 4.25; NaOH 0.2 N; Temperatur 55 °C. Die Zeitgeber wurden wie folgt eingestellt: Z_1 1800, Z_2 2900, Z_3 4500 und Z_4 1200. Die Chromatogramme wurden nach dem Prinzip: Halbwertsbreite x Höhe ausgewertet. Mit Hilfe von Standardsubstanzen wurden die Umrechnungsfaktoren ermittelt. Als interner Standard diente p-Nitrophenylalanin.

3) Konvertierung von Aminosuckern zu den korrespondierenden Pentosen

UDPNacGM und UDPNacGALM wurden durch Dünnschichtchromatographie (46), sowie durch chromatographische Analyse ihrer durch Hydrolyse (4 h bei 100 °C in 3 N HCl) und Behandlung mit Ninhydrin (82) gewonnenen Pentoseanalogen identifiziert. Für die Konvertierung wurde die UDPNacHexosamin enthaltende Sammelfraktion verwendet, die nach Fraktionierung eines Inkubationsansatzes von explantierten Speicheldrüsen mit ^{14}C -Glucosamin anfiel. Nach der Behandlung mit Ninhydrin wurden die Pentosen über eine Mischbettaustauscher-Säule ($\emptyset$ 5 mm) mit DOWEX 50x8, H^+ -Form, und DOWEX 1x8, OH^- -Form, gereinigt. Auf den Dünnschichtplatten (51) sind dann UDPNacGM durch Arabinose und UDPNacGALM durch Lyxose vertreten.

C) ERGEBNISSE

I. Ausarbeitung einer geeigneten Trennmethode für Glucosamin-Metabolite

Das Gewicht einer Speicheldrüse von *Drosophila virilis* läßt sich auf ca. 0.1 mg schätzen. Sollte der Zeitaufwand für die Präparation noch vertretbar sein und das präparierte Gewebe noch genügend frisch, so ließ sich mit maximal 2-4 mg Speicheldrüsenmaterial rechnen, was eine sorgfältige Ausarbeitung der Methoden zur quantitativen Bestimmung der einzelnen Metabolite und Enzymaktivitäten im Mikromaßstab erforderte. Während die Enzyme z.T. noch, wie unten gezeigt wird, mit Hilfe colorimetrischer Tests erfaßt werden können, mußten für die Isolierung und Quantifizierung der Metabolite Isotopenmethoden verwendet werden.

Für die Trennung der Metabolite wurde die Anionenaustausch-Chromatographie an DOWEX-Säulen (1x8, HCOO⁻-Form) gewählt, die oftmals erfolgreich zur Fraktionierung phosphathaltiger Metabolite eingesetzt worden ist (38-41). Keine der genannten Methoden konnte unverändert übernommen werden, da entweder mit größeren als Nanomolmengen gearbeitet wurde, oder bestimmte Metabolite gar nicht untersucht worden sind, und weil darüber hinaus bei allen Elutionen stufenlose Gradienten verwendet wurden anstelle eines Stufengradienten, der die chromatographische Trennung vereinfacht und beschleunigt hat.

1) Standardisierung der Elutionsbedingungen

Die Elutionsbedingungen wurden für alle jene Metabolite erstellt, die aufgrund der inzwischen bei Pflanzen und Tieren nachgewiesenen Reaktionskette des Glucosamin-Stoffwechsels erwartet wurden (Fig. 4): In erster Linie die Vorstufen der Mucopolysaccharide, GM-6-P, NAcGM-6-P, NAcGM-1-P, UDPNAcGM und UDPNAcGALM. Da in den geplanten Untersuchungen als Ausgangssubstrate radioaktiv markier-

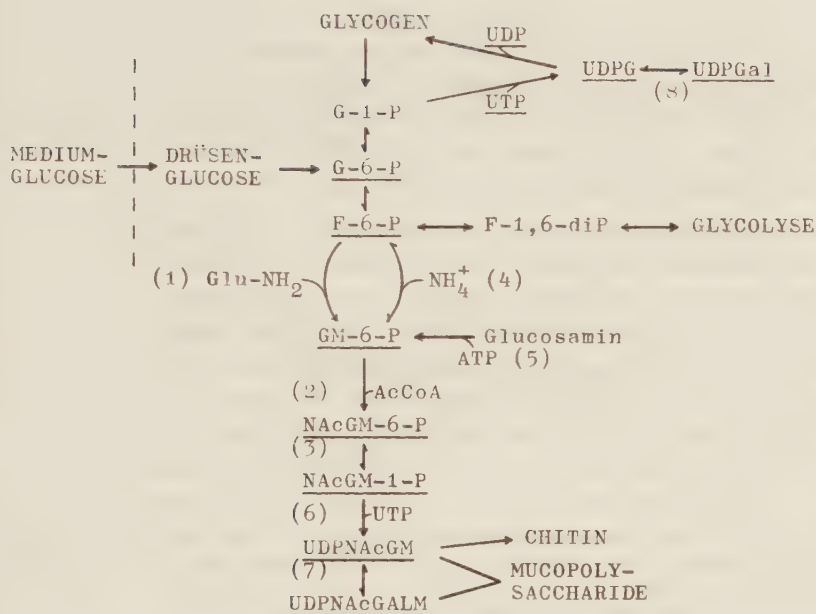


Fig. 4

Schema des Glucosamin-Stoffwechsels (nach Hughes, (52), abgewandelt). De facto irreversible Reaktionen sind durch einfachen Pfeil gekennzeichnet. Die Nummern 1-8 repräsentieren die Enzyme Glu-NH₂-F-6-P-Aminotransferase (1), Glucosamin-Phosphat-Acetyltransferase (2), N-Acetylglucosamin-Phosphomutase (3), Glucosamin-Phosphat-Isomerase (4), Glucosamin-Kinase (5), UDP-N-Acetylglucosamin-Pyrophosphorylase (6), UDP-N-Acetylglucosamin-4-Epimerase (7) und UDPGlucose-4-Epimerase (8).

Die unterstrichenen Metabolite wurden mit Hilfe der beschriebenen Methoden quantitativ erfaßt.

te Glucose und F-6-P eingesetzt wurden, mußten auch F-6-P und G-6-P als Bezugsgrößen erfaßt werden. Weil weiterhin in Doppelmarkierungsexperimenten neben ^3H -Glucose auch ^{14}C -Uridin als Substrat angeboten wurde, mußten bei der Elution neben den UDP-Zuckern auch noch UMP, UDP und UTP erfaßt werden.

Bei der Ermittlung eines geeigneten Stufengradienten von Ameisensäure und Ammoniumformiat wurde zunächst mit einem Gemisch der genannten Substanzen gearbeitet. Die Identität der einzelnen Metabolite im Eluat wurde durch kontinuierliche Registrierung der Extinktion bei 254 nm und Vergleich mit authentischen Substanzen, durch optischen Test mit geeigneten Enzymen, oder durch spezifische Farbreaktionen festgestellt. Für die Trennung von Substanzmengen bis zu 40 µg jeder Einzelkomponente erwies sich eine Austauschersäule von 2 mm Durchmesser und mindestens 600 mm Länge als ausreichend.

Der als erster aus der Säule austretende Metabolit, GM-6-P, ist in seiner Affinität zum Austauscherharz vom pH des äquilibrierten DOWEX-Materials und von der Temperatur besonders stark abhängig (Tab. 3). Die übrigen Metabolite, z.B. F-6-P, waren davon weniger betroffen. Alle Chromatographien wurden daher bei einer Temperatur von 25.5 °C durchgeführt, und die Säule genau auf einen Ausgangs-pH von 4.25 äquilibriert. Diese Bedingungen garantierten außerdem, daß GM-6-P deutlich getrennt von den Frontfraktionen (1-8) eluiert wurde, in denen die nicht phosphorylierten Substrate Glucose, Glucosamin und Uridin von der Säule gewaschen wurden. Ein typisches Elutionsprofil unter den endgültigen Standardbedingungen zeigt Abb. 5, oben. Die Abweichungen in der Lage der einzelnen Gipfel betrugen von Versuch zu Versuch höchstens eine Fraktion, im allgemeinen war die Lage völlig identisch.

Aus Abb. 5 ist zu ersehen, daß die Säulenchromatographie nicht zu einer vollständigen Trennung aller Metabolite führt. Zur Erreichung dieses Zielés mußten

Tab. 3

Elution von GM-6-P und F-6-P von einer DOWEX 1x8-Säule
(2x600 mm; HCOO^- -Form);

(a) bei konstanter Temperatur (25.5°C) und variablem
Anfangs-pH,

(b) bei konstantem Anfangs-pH (4.30) und variabler
Temperatur.

Die Elution erfolgte mit Hilfe eines Stufengradienten,
der im Verlauf der weiteren Untersuchungen noch etwas
abgewandelt wurde. Die Zahlen in Klammern repräsentieren
die Gipfelfraktion, bei der die jeweilige Komponente
eluiert wurde.

Fraktion	1 - 14	15 - 27	28 - 34	35 - 43
Elutions- mittel	H_2O	0.0015 N HCOOH	4 N HCOOH	4 N $\text{HCOOH} +$ 0.12 N HCOONH_4
(a)				
pH: 3.62	GM-6-P (3)			F-6-P (40)
pH: 3.75	GM-6-P (4)			F-6-P (39)
pH: 4.00	GM-6-P (4)			F-6-P (40)
pH: 4.15	GM-6-P (4)			F-6-P (40)
pH: 4.25 bis 6.25		GM-6-P (21-22)		F-6-P (40-41)
(b)				
mp: 18°C		GM-6-P (22-23)		F-6-P (40)
mp: 20°C		GM-6-P (22)		F-6-P (40)
mp: 25.5°C		GM-6-P (21-22)		F-6-P (40-41)
mp: 30°C		GM-6-P (17-19)		F-6-P (38-40)

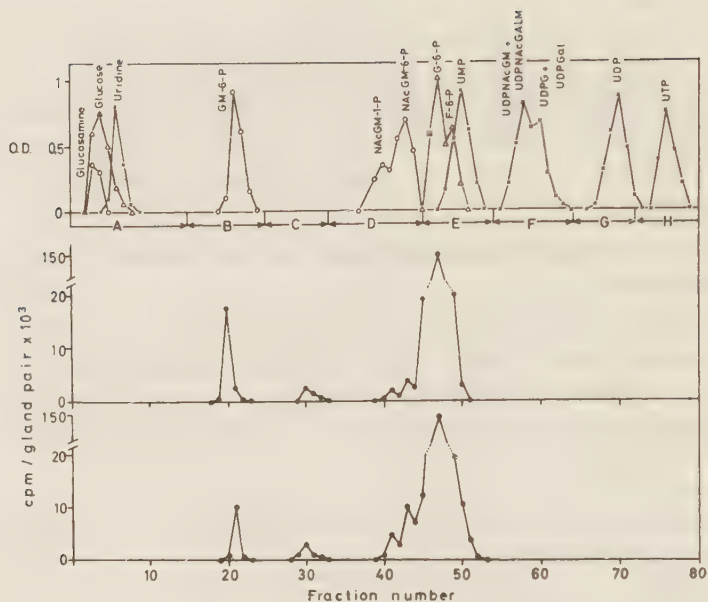


Abb. 5

Chromatographie von Substraten und Metaboliten der Mucopolysaccharid-Synthese an DOWEX 1x8 (HCOO⁻-Form).

Oben: Standardprofil. Mitte: Metabolite nach Inkubation von Speicheldrüsenhomogenaten mit ¹⁴C-F-6-P (2.3 µCi/250 µl Inkubationsgemisch). Unten: Gleiche Bedingungen, aber Zusatz von 1 mM AcCoA. F-6-P-Konzentration 2 mM, Glu-NH₂-Konzentration 3 mM; pH 6.85.

Die Stufen des Elutionsmediums waren (Fraktionsgrenzen in Klammern):

A: H ₂ O	(15)	E: 4 N HCOOH + 0.12 N HCOONH ₄	(54)
B: 0.005 N HCOOH	(25)	F: 4 N HCOOH + 0.30 N HCOONH ₄	(64)
C: 3.0 N HCOOH	(33)	G: 4 N HCOOH + 0.65 N HCOONH ₄	(72)
D: 4.0 N HCOOH	(45)	H: 4 N HCOOH + 1.32 N HCOONH ₄	(80)

Die Symbole bedeuten: Optische Dichte bei 254 nm (X), 360 nm (Δ) und 578 nm (○) im Standardprofil, und ¹⁴C-Aktivität (●) in den Abb. Mitte bzw. unten.

die Mischfraktionen durch Dünnschichtchromatographie in die Einzelkomponenten aufgetrennt werden. Die für die einzelnen Fraktionen verwendeten Chromatographiesysteme sind in Tabelle 1 (Material und Methoden) aufgeführt.

2) Chromatographische Hilfsmaßnahmen

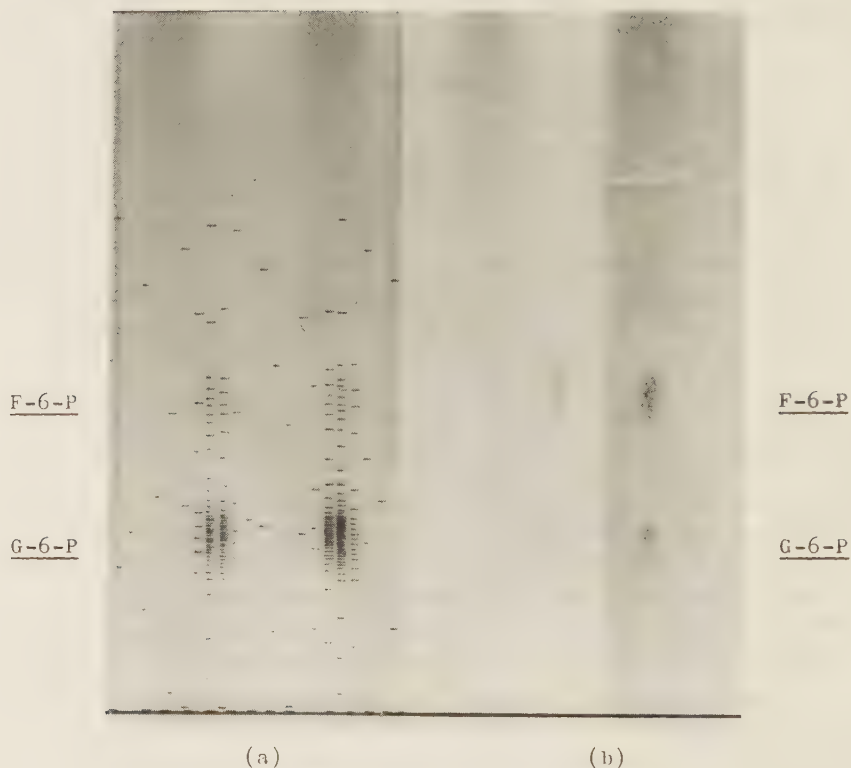
Die Bestimmung der relativen Anteile von NacGM-1-P und NacGM-6-P in den Fraktionen 38-45 (siehe das Elutionsprofil der Abb. 5, oben) bereitete insofern größere Schwierigkeiten, als von drei untersuchten Dünnschichtchromatographie-Systemen (32, 43, 56) nur in einem (System E, siehe Tab. 1) zwei Flecke identifiziert werden konnten. Diese waren jedoch nicht vollständig getrennt. Da unter diesen Bedingungen die beiden Phosphatester nicht exakt quantifiziert werden konnten, wurde als Kontrolle der Anteil des 1-Phosphatesters in diesem Doppelfleck auch indirekt bestimmt, indem eine Probe der Sammelfraktion mit 0.1 N HCl für 10 min auf 100 °C erhitzt wurde. Unter diesen Bedingungen wird NacGM-1-P in NacGM und anorganisches Phosphat (P_i) gespalten, NacGM-6-P jedoch nicht (36, 43). Da NacGM im System E auf der Dünnschichtplatte nicht wandert, erhält man nach erfolgter Chromatographie nur noch den reinen NacGM-6-P-Fleck. Die Differenz zwischen der im Doppelfleck einer nicht-hydrolysierten Probe vorgefundenen Gesamtmenge an NacGM-Phosphat und der in einer identischen Probe nach saurer Hydrolyse vorgefundenen NacGM-6-P-Menge entspricht somit dem Anteil des NacGM-1-P. Diese Art der Bestimmung lieferte ähnliche Werte wie die direkte Bestimmung von NacGM-1-P und NacGM-6-P in einem Doppelfleck.

In allen Fällen, in denen die Gipfel der NacGM-Phosphate niedrig im Vergleich zum Hexose-6-Phosphat-(H-6-P-) Gipfel waren (siehe z.B. die Elutionsprofile der Abb. 5, Mitte und unten), wurden die NacGM-Phosphate nicht vollständig von den H-6-Phosphaten getrennt. Da in der nachgeschalteten Dünnschichtchromatographie im System E NacGM-1-P und H-6-P dieselbe Mobilität aufweisen, war es nötig, den NacGM-1-P-Anteil als Differenz zwischen der Gesamtmarkierung (NacGM-1-P- und H-6-P-Anteil) in dem System E und der Markierung des H-6-P-Anteils, der im System B (s.u.) rein erhalten wurde, zu ermitteln.

Die in der Sammelfraktion (Fraktionen 45-53) vorliegenden Phosphatzucker G-6-P und F-6-P wurden im System B (Tab. 1) getrennt (Abb. 6).

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Mischfraktionen von UDPHexosamin und UDPHexose (Fraktionen 55-64, siehe Abb. 5, oben) wird an gegebener Stelle beschrieben.

Abb. 6



Dünnschichtchromatographische Trennung und Identifizierung der von DOWEX 1x8 eluierten Hexose-6-Phosphate (Fraktionen 45-53; siehe Abb. 5, mitte und unten).

Dieselbe Dünnschichtplatte ist gezeigt nach

- (a) Lokalisation der Radioaktivität mit dem Berthold-Scanner mit Punktdrucker,
- (b) phosphatspezifischer Färbung mit dem Hanes-Isherwood-Reagens.

Die beiden aufgetragenen Substanzproben stammen aus verschiedenartigen Inkubationen.

3) Ausbeutemessungen

Um die Verluste während der Reinigungsprozedur zu ermitteln, wurde für kommerziell bezogenes, sowie für das im Inkubationsansatz gebildete GM-6-P die Ausbeute nach jedem einzelnen Trennschritt bestimmt (Tab. 4a). Während für reines GM-6-P keine nennenswerten Verluste gefunden wurden, war die Ausbeute für das in Drüsen-homogenaten synthetisierte GM-6-P schon nach dem ersten Schritt anscheinend deutlich vermindert (78 %). Dies geht jedoch wahrscheinlich darauf zurück, daß bei der Inkubation des Homogenats neben GM-6-P auch NAcGM-6-P gebildet wird, das im Elson-Morgan-Test, der für die quantitative Bestimmung diente, ebenfalls erfaßt wird, woraus ein zu hoher Ausgangswert für GM-6-P resultiert (NAcGM-1-P ergibt, wie auch experimentell nachgeprüft wurde, im Elson-Morgan-Test keine Färbung - (36) -). Die Annahme wird durch den Befund gestützt, daß die getrennte Bestimmung der beiden Metabolite in einem anderen Experiment (Tab. 5) unter gleichen Reaktionsbedingungen 17 % NAcGM-6-P und 83 % GM-6-P ergab. Man darf also für GM-6-P eine Wiederfindung von ca. 90-95 % annehmen.

Bei allen übrigen Metaboliten wurde die Ausbeute nur am Ende der gesamten Trennprozedur bestimmt (Tab. 4b). In allen Fraktionen, die zur Entfernung der Ammoniumionen an DOWEX 50 rechromatographiert werden mußten (ab Fraktion 46, siehe Material und Methoden), ergaben sich im Vergleich zur NAcGM-Phosphat-Fraktion, für die diese Maßnahme nicht getroffen werden mußte, etwas niedrigere Werte. Noch weiter vermindert waren die Ausbeuten von UDPNAcGM sowie UDPG und UDPGal. Dies ist wohl auf die Säurelabilität dieser Metabolite zurückzuführen (53, 54). In eigenen Untersuchungen sowohl mit nicht-markierter als auch mit radioaktiv markierter Substanz wurde während des gesamten Trennvorgangs für UDPNAcGM ein 15 %-iger Abbau zu UMP gemessen. Die UDPHexosen wurden zu 20 bis 25 % in UMP und UDP gespalten. Diese Abbauprodukte wurden anhand ihrer R_f -

Tab. 4

(a) Ausbeuten von GM-6-P im Elson-Morgan-Test nach den verschiedenen Reinigungsschritten. Als Ausgangsmaterial dienten 200 µl aus einem in vitro-Ansatz zur Bestimmung der Glu-NH₂-F-6-P-Aminotransferase-Aktivität im 15.000 g-Überstand, mit 20 mM F-6-P und 3 mM Glu-NH₂ als Substraten, pH 6.82 (siehe Material und Methoden). Zum Vergleich wurden 200 µl einer Lösung mit kommerziellem GM-6-P (0.2 mg/ml) in gleicher Weise chromatographiert.

	kommerzielles GM-6-P				in vitro-Ansatz	
	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.4	Exp.1	Exp.2
Ausgangslösung	100	100	100	100	100	100
Eluat nach Säulenchromatogr.	104	100	95	96	78	78
Eluat nach Säulenchromatogr. und Dünnschichtchr.	---	---	93	93	75	---
Eluat nach Säulenchromatogr., Dünnschichtchr. und wiederholter Säulenchromatogr.	---	---	91	90	---	---

(b) Ausbeuten kommerzieller Phosphatmetabolite nach Säulenchromatographie an DOWEX 1x8 bzw. 50x8 und Dünnschichtchromatographie, gemessen im Elson-Morgan-Test bzw. bei 254 nm. Es sind die Mittelwerte mit den Abweichungen vom Mittelwert angegeben, und zwar in % der Ausgangskonzentrationen. Jeweils mindestens zwei Versuche.

Metabolit*	Wiederfindungsrate
NAcGM-1-P	92 ± 3.5
NAcGM-6-P	91 ± 3
G-6-P	83 ± 4
F-6-P	82 ± 3
UMP	77 ± 3
UDPG	60 ± 5.5
UDPGal	58 ± 5
UDPNAcGM	69 ± 3.5
UDP	80 ± 2
UTP	76 ± 4

* Die Metabolite sind in der Reihenfolge ihrer Elution angeordnet.

Werte in den Systemen A_I und A_{II} identifiziert; darüber hinaus anfallende Spaltprodukte blieben unberücksichtigt.

Durch weitestgehende Standardisierung wurde dafür gesorgt, daß immer streng identische Trennbedingungen herrschten. Die späteren Resultate können deshalb ohne die Einführung von Korrekturfaktoren verglichen werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß durch die Kombination der säulenchromatographischen Methode mit verschiedenen Dünnschichtverfahren alle (insgesamt 12) interessierenden Aminosuckerderivate, Uridinnucleotide und Zuckerphosphate aus Mikroansätzen (die Drüsenhomogenate enthielten ca. 300-500 µg Protein, davon etwa 30-40 % lösliches Protein) aufgetrennt und quantitativ bestimmt werden konnten. Damit wurde es möglich, diesen wichtigen Stoffwechselweg in den Speicheldrüsen quantitativ zu erfassen und ihn mit den bekannten cyto-genetischen Befunden in Beziehung zu setzen.

II. Untersuchung des Glucosamin-Stoffwechsels in Speicheldrüsen in vitro und "in vivo"

1) Zwei Experimente in vitro zur Prüfung der Methode

Die Brauchbarkeit der entwickelten Methode wurde zunächst in Versuchen zur enzymatischen Synthese von GM-6-P aus Glu-NH₂ und ¹⁴C-markiertem F-6-P geprüft. In einer früheren Arbeit (28) war gezeigt worden, daß im Überstand von Speicheldrüsenhomogenaten (Alter der Tiere: 140 h nach Eiablage) das Enzym Glu-NH₂-F-6-P-Aminotransferase sehr aktiv ist. In Ansätzen, die unter denselben Bedingungen wie damals inkubiert wurden, sollte der Einbau von ¹⁴C-F-6-P in GM-6-P und möglicherweise weitere Metabolite untersucht werden. Für die im Anschluß an die Inkubation durchgeführte Säulenchromatographie war das Elutionsprofil der Abb. 5, Mitte, charakteristisch.

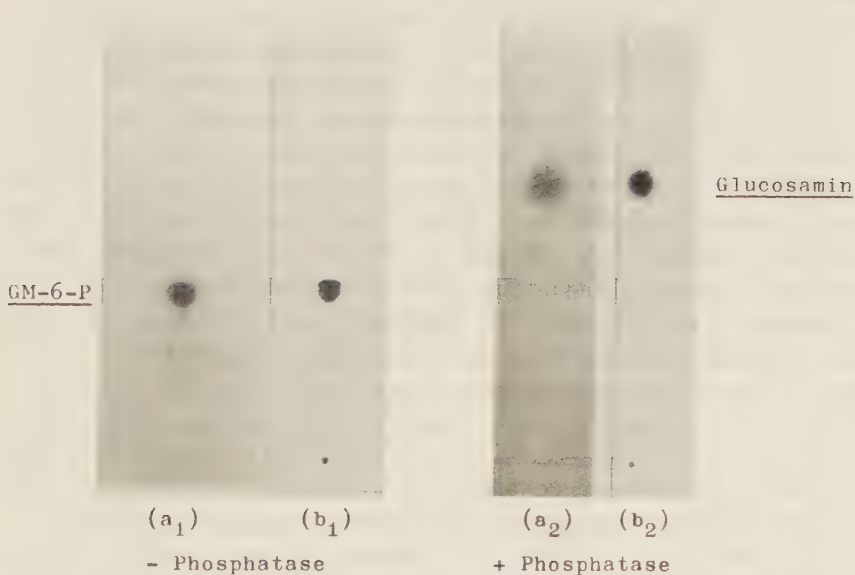
Die Radioaktivität in den Fraktionen 20-23 war ausschließlich auf GM-6-P zurückzuführen. Die Dünnschichtchromatographie dieser Fraktion in den Systemen C und D (Tab. 1) ergab jeweils einen einzigen markierten Fleck in der Position authentischer Substanz (Abb. 7 a,b). Um die Identität des GM-6-P zusätzlich zu sichern, wurden Proben mit saurer Phosphatase in 0.25 M TRIS-Maleat-Puffer, pH 5.1 für 2 h bei 37 °C inkubiert (55). Das Reaktionsprodukt hatte in den Systemen C und D denselben R_F-Wert wie authentisches Glucosamin (Abb. 7 c,d).

Die in den Fraktionen 29-33 vorgefundene Radioaktivität dürfte auf Lactat und Pyruvat zurückzuführen sein, die als glycolytische Umsetzungsprodukte der H-6-Phosphate entstehen. In separaten Trennexperimenten mit authentischer radioaktiver Substanz wurden sie in den gleichen Fraktionen eluiert. Eine weitergehende Charakterisierung dieser Fraktionen wurde allerdings nicht vorgenommen.

Der Bereich der NAcGM-Phosphate (Fraktionen 38-45) wies einen schwachen Einbau auf. Die Bestimmung der relativen Anteile von NAcGM-1-P und NAcGM-6-P wurde in der unter I. 2) angegebenen Weise ausgeführt.

Die ineinander übergehenden Gipfel von NAcGM-1-P und NAcGM-6-P, sowie G-6-P und F-6-P wurden nach Chromatographie in den Systemen B und E (vgl. ebenfalls I. 2) z.T. indirekt in die Einzelkomponenten aufgetrennt.

Abb. 7



Identifizierung des von DOWEX 1x8 eluierten GM-6-Ps (Fraktionen 20-23; siehe Abb. 5, mitte und unten) im Dünnschichtchromatographie-System D; (a₁, b₁) vor, und (a₂, b₂) nach Spaltung mit saurer Phosphatase.

a₁, a₂: Farbentwicklung mit Ninhydrin.

b₁, b₂: Lokalisation der Radioaktivität mittels Autoradiographie (Kodak X-Omat, XR-5-Film; Expositionszeit: drei Tage).

In diesen Experimenten waren von den Glucosamin-Metaboliten neben dem GM-6-P nur noch die beiden NAcGM-Phosphate, und dazu nur schwach, markiert. Dies wurde darauf zurückgeführt, daß die Cofaktoren für die entsprechenden Enzymreaktionen (siehe Reaktionsschema Fig. 4, Reaktionen 2 und 6) in der Konzentration, in der sie endogen vorlagen, nicht ausreichten. In der Tat war nach Zugabe von AcCoA zum Reaktionsansatz in den Fraktionen, die die NAcGM-Phosphate enthalten, die Markierung erhöht (Abb. 5, unten). Die quantitative Auswertung nach der Dünnschichtchromatographie zeigte, daß die Radioaktivität der GM-6-P-Fraktion auf die Hälfte gesunken war, während sie in der NAcGM-Phosphat-Fraktion um das 3-fache gesteigert war (Tab. 5). Das Verhältnis von NAcGM-1-P zu NAcGM-6-P lag mit einem Wert von 0.24 in der Nähe des Gleichgewichtsverhältnisses, das mit 0.16 angegeben wird (57).

Tab. 5

Einbau von ^{14}C -F-6-P (2.3 μCi , 250 μl Inkubationsgemisch) in GM-6-P und Folgemetabolite nach 45 min Inkubation des 15.000 g-Überstandes (F-6-P-Konzentration: 2 mM, Glu-NH₂-Konzentration: 3 mM; pH 6.85) bei An- bzw. Abwesenheit der Cofaktoren AcCoA (1 mM) und UTP (3 mM). Die Daten sind Mittelwerte aus zwei Versuchen, angegeben in Ipm/Drüsenpaar.

	GM-6-P	NAcGM-6-P	NAcGM-1-P
ohne Cofaktoren	20500	4300	1600
+ AcCoA	10600	19700	4600
AcCoA + UTP	10700	29400	7000

Da kein Einbau in die UDPNacHexosamin-Fraktion erfolgte, wurde neben AcCoA noch UTP als Cofaktor der UDP-N-Acetylglucosamin-Pyrophosphorylase (Fig. 4, Reaktion 6) zum Inkubationsansatz gegeben. Auch dann war

diese Fraktion nicht markiert (Abb. 5). Um den Faktor 1.5 erhöht war allerdings die Radioaktivität beider NAcGM-Phosphate, während der ^{14}C -Einbau in GM-6-P auf demselben Niveau blieb.

Die Bildung von GM-6-P wurde schließlich zum Vergleich mit einer unabhängigen Methode bestimmt. Im selben Reaktionsansatz wurde die enzymatische Synthese von GM-6-P einerseits colorimetrisch mit dem Elson-Morgan-Test, andererseits mit Hilfe der chromatographischen Trennung und Quantifizierung von GM-6-P nach Einbau von markiertem F-6-P gemessen. Die Glu-NH₂-F-6-P-Aminotransferase ist in larvalen Speicheldrüsen außerordentlich aktiv, während sie in Drüsen aus Vorpuppen keine signifikante Aktivität mehr aufweist (28). Tab. 6, a zeigt, daß beide Nachweismethoden zu analogen Resultaten führen.

Da diese entwicklungsbedingte Abnahme der Aminotransferase-Aktivität durch Injektion von Ecdyson induziert werden kann (58), wurden beide Nachweismethoden auch in derartigen Experimenten verglichen. In beiden Fällen wurde eine Abnahme auf ca. 10 % der Ausgangskonzentration an GM-6-P festgestellt (Tab. 6, b).

Tab. 6

Bestimmung der Aktivität der Glu-NH₂-F-6-P-Aminotransferase im Speicheldrüsenhomogenat (F-6-P: 2 mM, Glu-NH₂: 3 mM; pH 6.82) mit dem Elson-Morgan-Test bzw. dem Einbau von ^{14}C -F-6-P (1.0 μCi /250 μl Inkubationsgemisch) in GM-6-P. Mittelwerte aus mindestens zwei Versuchen. Die Werte in Klammern sind %.

(a) Vergleich Larve - Vorpuppe

	Elson-Morgan ($\frac{\text{nMole GM-6-P}}{\text{Drüsenpaar}}$)	Isotopenmethode ($\frac{\text{Ipm}}{\text{Drüsenpaar}}$)
Larve	3.51	8213
Vorpuppe	0.13	-83*

(b) Wirkung von 10 ng Ecdyson

Kontrolle	3.44 (100)	5621 (100)
Injizierte Tiere	0.26 (8)	562 (10)

* Die negativen Werte erklären sich daraus, daß die Nullwerte der Radioaktivität höher waren als die Werte nach 45 min.

2) Kinetische und ontogenetische Charakterisierung der Synthese von GM-6-P und NAcGM-6-P in vitro

Da GM-6-P, NAcGM-6-P und NAcGM-1-P bei Inkubation des 15.000 g-Überstandes mit ^{14}C -F-6-P, Glu-NH₂ und AcCoA radioaktiv markiert werden (Abb. 5, unten; Tab. 5), sollten sich folgende, an der Synthese dieser Metabolite beteiligten Enzyme in Speicheldrüsen von *D. virilis* nachweisen lassen:

(1) Glu-NH₂-F-6-P-Aminotransferase (im Folgenden kurz "Aminotransferase" genannt; siehe Fig. 4, Reaktion 1), die die Synthese von GM-6-P aus F-6-P und Glu-NH₂ "irreversibel" katalysiert (52, 59).

(2) Glucosamin-Phosphat-Acetyltransferase (im Folgenden kurz "N-Acetylase"; Fig. 4, 2), die GM-6-P unter Beteiligung von AcCoA zu NAcGM-6-P acetyliert (60, 61, 62).

(3) N-Acetylglucosamin-Phosphomutase (im Folgenden kurz "NAcGM-P-Mutase"; Fig. 4, 3), die NAcGM-6-P in NAcGM-1-P umwandelt (57, 59).

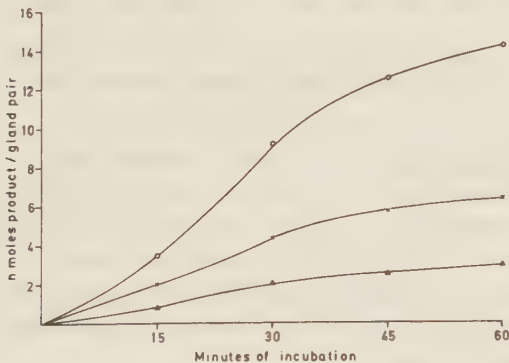
(4) Die Synthese von GM-6-P kann nicht nur von der Aminotransferase, sondern auch durch ein anderes Enzym, die Glucosamin-Phosphat-Isomerase (im Folgenden kurz "GM-P-Isomerase"; Fig. 4, 4), katalysiert werden (62, weitere Lit. bei 55). Dieses Enzym benötigt F-6-P und NH₄⁺ als Substrate. In unserer früheren Arbeit (28) hatte es in Totalhomogenaten von *D. virilis*-Larven zwar nicht nachgewiesen werden können; da jedoch nicht auszuschließen war, daß dieser negative Befund methodisch bedingt war, wurde das Vorkommen der GM-P-Isomerase im Rahmen dieser Untersuchungen an Speicheldrüsenhomogenaten erneut geprüft.

Die Aktivität der Enzyme GM-P-Isomerase, Aminotransferase und N-Acetylase wurde in Speicheldrüsenhomogenaten in dem früher schon verwendeten TEG-Puffer (28) gemessen. In allen drei Enzymansätzen war eine Produktsynthese mit Hilfe des Elson-Morgan-Tests nachweisbar. Sie verlief, abgesehen von einer kurzen Lag-Phase, in allen drei Fällen während der ersten 45 min der Inkuba-

tion mit ausreichender Geschwindigkeit, um danach deutlich langsamer zu werden (Abb. 8). Es wurde deshalb für sämtliche Enzymtests ein Inkubationszeitraum von 45 min gewählt.

Abb. 8

Bildung von GM-6-P bzw. NAcGM-6-P in Speicheldrüsenhomogenaten als Funktion der Zeit. Standardansätze von Glucosamin-Phosphat-Isomerase (Δ), Glu-NH₂-F-6-P-Aminotransferase (x) und Glucosamin-Phosphat-Acetyltransferase (o). Zu den angegebenen Zeiten der Inkubation wurden 100 μ l-Aliquots aus dem Reaktionsgemisch entnommen, und das Produkt im Elson-Morgan-Test bestimmt. Mittelwerte aus zwei Versuchen.



a) Kinetische Eigenschaften der an der GM-6-P- und NAcGM-6-P-Synthese beteiligten Enzyme

Das pH-Optimum für die Aminotransferase in Speicheldrüsenhomogenaten entsprach mit einem Wert von 6.8 dem früher in Totalhomogenaten von *D. virilis*-Larven gefundenen (28). Die Michaelis-Konstanten (K_m) für die Substrate F-6-P und Glu-NH₂ wurden, wie für alle übrigen Enzyme auch, mit Hilfe von Lineweaver-Burk-Diagrammen ermittelt. Es ergaben sich Werte von 1.1 mM für F-6-P (Abb. 9, a₁) und 0.25 mM für Glu-NH₂ (Abb. 9, a₂).

Abb. 9

Lineweaver-Burk-Diagramme der Aktivitäten verschiedener Enzyme in Speicheldrüsenhomogenaten. Jeweils Standardansätze, Abweichungen wie angegeben. Jeder Punkt ist der Mittelwert zweier Experimente.

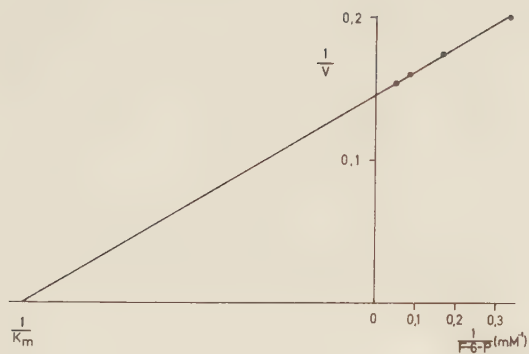
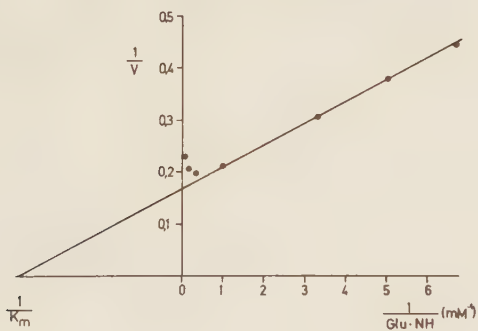
(a₁, a₂) Glu-NH₂-F-6-P-Aminotransferase: (a₁) F-6-P als variables und Glu-NH₂ (3 mM) als konstantes Substrat; (a₂) Glu-NH₂ als variables und F-6-P (10 mM) als konstantes Substrat.

(b) Glucosamin-Phosphat-Acetyltransferase: GM-6-P als variables und AcCoA (1 mM) als konstantes Substrat.

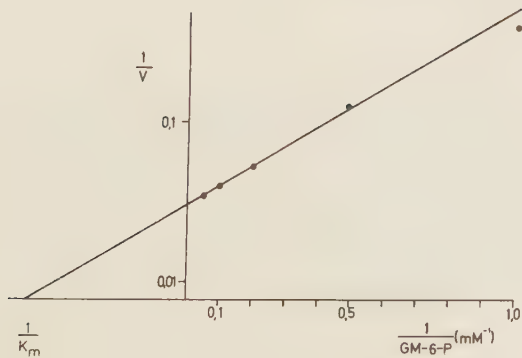
(c₁, c₂) Glucosamin-Phosphat-Isomerase: Ansätze in Abwesenheit (○) oder Anwesenheit (20 mM) von G-6-P (●). Bei den Versuchen ohne G-6-P war der pH-Wert des Inkubationsgemisches auf 6.6 eingestellt, bei den anderen auf pH 7.4. (c₁) F-6-P als variables und NH₄Cl (20 mM) als konstantes Substrat; (c₂) NH₄Cl als variables und F-6-P (10 mM) als konstantes Substrat.

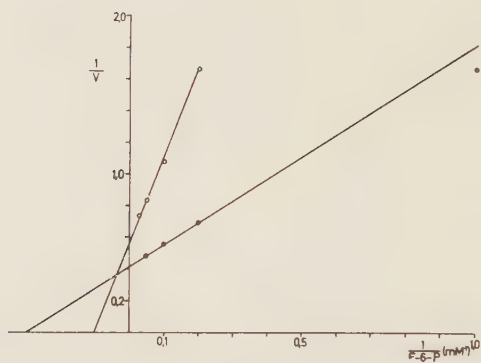
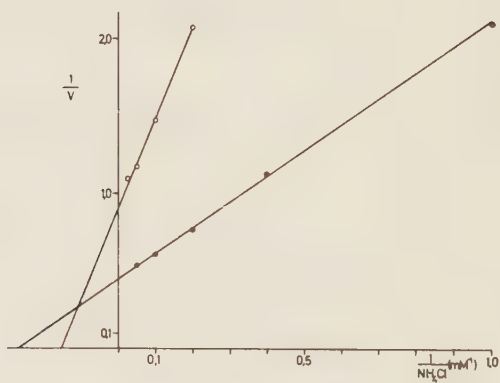
(d) Phosphoglucose-Isomerase: F-6-P als variables Substrat. Inkubationsbedingungen wie im Aminotransferase-Test, aber ohne Glu-NH₂.

Die Dimension der Ordinaten ($\frac{1}{v}$) ist in allen Abbildungen nMole Substratumsatz/Drüsenpaar x 45 min.

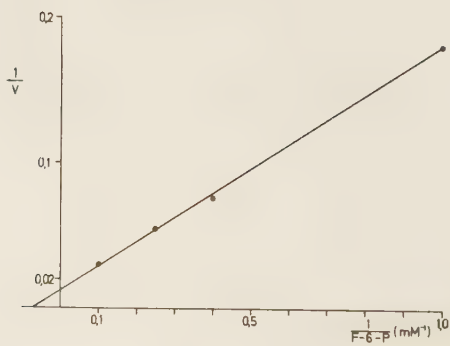
(a₁)(a₂)

(b)



(c₁)(c₂)

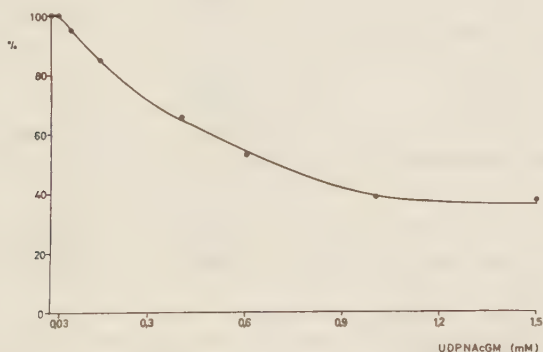
(d)



Bei allen untersuchten Eukaryonten wird die Aktivität der Aminotransferase durch einen allosterischen Effektor, UDPNacGM (63-71), bei manchen auch durch das Substrat Glu-NH₂ (69, 72-74) gehemmt. Beide Hemmeffekte treffen auch für das Enzym aus *D. virilis* zu und konnten sowohl in Totalhomogenaten (28) als auch in Homogenaten von Speicheldrüsen nachgewiesen werden. Im Fall der Hemmung durch UDPNacGM mußten für eine 50 %-ige Restaktivität der Aminotransferase in Drüsenhomogenaten 0.4 mM UDPNacGM eingesetzt werden, während in Totalhomogenaten dafür nur 0.025 mM notwendig waren (Abb. 10).

Abb. 10

Hemmung der Glu-NH₂-F-6-P-Aminotransferase durch UDPNacGM. Aufgetragen ist die Restaktivität bei verschiedenen Konzentrationen von UDPNacGM in Prozent des Kontrollansatzes. Standardansatz mit Speicheldrüsenhomogenaten, jeweils Mittelwerte aus drei Versuchen.



Die Abnahme der Extinktion im Elson-Morgan-Test bei Erhöhung der Glu-NH₂-Konzentration über 1 mM (siehe Abb. 9, a₂) wurde als Ausdruck einer Substrathemmung interpretiert. Die andere Möglichkeit, nämlich eine Beeinflussung des Farbtests durch Glu-NH₂, das als primäres

Amin den Test beeinträchtigt (75), wurde in einer Versuchsserie geprüft (Tab. 7). Ein hemmender Einfluß machte sich jedoch erst ab 10 mM Glu-NH₂ bemerkbar, weshalb der Effekt einer Substrathemmung als bestätigt gelten darf.

Tab. 7

Einfluß verschiedener Glu-NH₂-Konzentrationen auf die Farbentwicklung im Elson-Morgan-Test. Die GM-6-P-Konzentration war in allen Versuchen 0.26 mM. Jeweils Mittelwerte aus drei Versuchen.

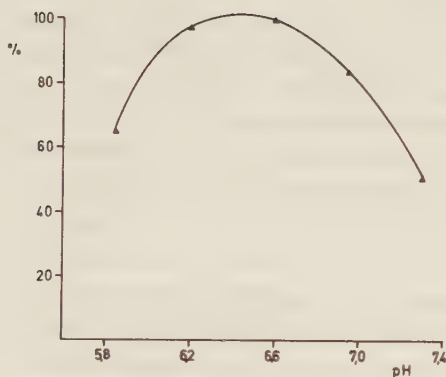
zugewetztes Glu-NH ₂ (mM)	relative Farbausbeute (%)
0	100
0.2	101
0.3	100
1.0	100
3.0	100
6.0	102
10.0	98
12.0	95
15.0	92

Abbildung 11, a zeigt, daß das Optimum der N-Acetylase-Aktivität bei einem pH-Wert von 6.5 lag. Die K_m für GM-6-P war 2.05 mM (Abb. 9, b).

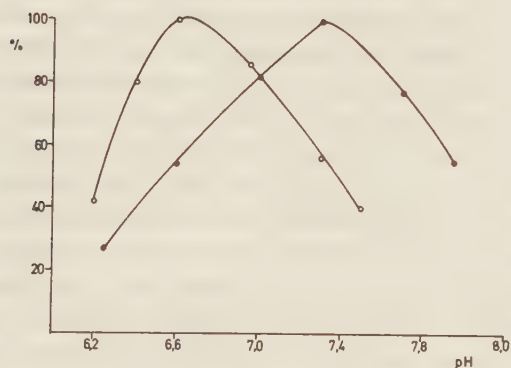
Für die GM-P-Isomerase wurde ein pH-Optimum von 6.6 ermittelt (Abb. 11, b). Das Enzym zeigt eine interessante, regulatorisch vielleicht bedeutsame Eigenschaft: In Gegenwart von 20 mM G-6-P verschiebt sich sein pH-Optimum von 6.6 nach 7.4 (Abb. 11, b). Das Enzym wird in der Hausfliege *Musca domestica* durch G-6-P aktiviert (55). In Speicheldrüsenhomogenaten wurde durch Zugabe von 10 mM G-6-P die Enzymaktivität verdoppelt, durch 20 mM G-6-P auf das 2.5-fache gesteigert. Höhere Konzentrationen des Aktivators konnten nicht eingesetzt werden, da sich unter

Abb. 11

(a)



(b)



Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivitäten von Glucosamin-Phosphat-Acetyltransferase (a) und Glucosamin-Phosphat-Isomerase (b) in Speicheldrüsenhomogenaten.

Standardansätze, für GM-P-Isomerase in Gegenwart von 20 mM G-6-P (●), oder ohne G-6-P (○). Messung der pH-Werte in dem Reaktionsgemisch (150 μ l) am Ende der Inkubation. Mittelwerte aus zwei Versuchen. Maximalaktivitäten normiert.

diesen Bedingungen die nicht enzymatische Bildung von GM-6-P aus Hexose-6-P und NH_4^+ (76; sowie eigene Ergebnisse) störend bemerkbar machte.

Die GM-P-Isomerase aus der Hautfliege wird durch NAcGM-6-P ebenfalls stimuliert. In einer kleinen Versuchsserie (vier Versuche) wurde diese Aktivierung auch für das Drosophila-Enzym nachgewiesen. Die Enzyme beider Organismen werden dabei bereits mit 1/10 der Konzentration, die für G-6-P aufgewendet werden muß, maximal stimuliert.

Die K_m -Werte der GM-P-Isomerase für F-6-P bzw. NH_4Cl waren 10 mM und 6.9 mM (Abb. 9, c_1 und c_2). Bemerkenswert ist, daß die Affinität der GM-P-Isomerase für beide Substrate durch G-6-P erhöht wurde. In Gegenwart des Aktivators verringerten sich deshalb die K_m -Werte auf 3.4 mM für F-6-P (Abb. 9, c_1) und 3.7 mM für NH_4Cl (Abb. 9, c_2).

Bei der Bestimmung der K_m -Werte für das Substrat F-6-P mußte davon ausgegangen werden, daß dessen aktuelle Konzentration aufgrund der Anwesenheit der Phosphoglucose-Isomerase (PGI) im Speicheldrüsenhomogenat nicht der eingesetzten Konzentration entsprach. Obwohl die PGI mit einer K_m von 14.3 mM für F-6-P (Abb. 9, d) eine im Vergleich zur Aminotransferase und GM-P-Isomerase geringe Affinität für F-6-P besitzt, liegt ihre Maximalaktivität mit 83 nMolen Substratumsatz/Drüsenpaar x 45 min weit höher als diejenige der Aminotransferase (7.5 nMole; Abb. 9, a_1) bzw. GM-P-Isomerase (2.3 nMole; Abb. 9, c_1). Dies deutet entweder auf eine vergleichsweise hohe Konzentration der PGI im Drüsenhomogenat hin, oder darauf, daß die Aktivierungsenergie für den Umsatz des Substrates klein ist. Dementsprechend sank im Verlauf der 45 minütigen Inkubation die Konzentration von F-6-P je nach seiner Ausgangskonzentration ab (Tab. 8), wobei sich die Wirkung der PGI bei niedrigen F-6-P-Konzentrationen am stärksten bemerkbar machte. Für diesen Fall geringer F-6-P-Konzentrationen stellte sich das Verhältnis von F-6-P : G-6-P auf 0.38 ein, einen Wert, der in der Nähe der Gleichgewichtskonstante (0.52) liegt.

Tab. 8

Veränderung der F-6-P- und G-6-P-Konzentration während 45 min Inkubation von Speicheldrüsenhomogenaten in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration an F-6-P. Die Konzentrationen wurden am Ende des Inkubationsintervalls bestimmt. Mittelwerte aus zwei Messungen.

Ausgangskonz., von F-6-P (mM)	1.0	2.5	10.0
F-6-P (mM)	0.26	0.87	6.7
G-6-P (mM)	0.69	1.63	3.2
F-6-P:G-6-P	0.38 *	0.53	2.1

* Nach 30 min Inkubation war bereits ein Wert von 0.35 erreicht.

Aus den genannten Gründen sollten die Kurven für F-6-P in den Lineweaver-Burk-Diagrammen von Aminotransferase (Abb. 9, a₁) und GM-P-Isomerase (Abb. 9, c₁) bei geringen Substratkonzentrationen (und dementsprechend hohen $\frac{1}{F-6-P}$ Werten) einen Trend zu geringeren Werten der Umsatzgeschwindigkeit (und damit höheren $\frac{1}{v}$ Werten) zeigen. Da die entsprechenden Punkte aber nicht von den Geraden abweichen, die durch die Werte der Umsatzgeschwindigkeiten bei hohen Substratkonzentrationen (niedrigen $\frac{1}{F-6-P}$ Werten) vorgezeichnet sind, muß der Einfluß der PGI eher als gering erachtet werden.

b) Ontogenie der GM-P-Isomerase, Aminotransferase und N-Acetylase

Zwischen 110 h und 161 h nach Eiablage wurden Speicheldrüsen präpariert, und die Aktivität von GM-P-Isomerase und N-Acetylase gemessen. Die Altersabhängigkeit der Aminotransferase war früher (28) bereits untersucht worden.

Da die molare Extinktion des in dieser Arbeit als Standard verwendeten GM-6-P (Na₂-Salz; Sigma) um den Faktor 1.6 höher gegenüber dem damals verwendeten GM-6-P (Ba-Salz; Nutritional Biochemicals Corp.) ist, wurden die Werte auf den neuen Standard umgerechnet.

Als Ursache für die geringere Farbausbeute des alten Standards wurde aufgrund dünnschichtchromatographischer Analyse im System C eine Verunreinigung verantwortlich gemacht, die sich neben dem GM-6-P-Fleck in einem zweiten, ninhydrinpositiven Substanzfleck ausdrückte.

Die im Rahmen dieser Arbeit stichprobenartig durchgeführten Bestimmungen der Aminotransferase-Aktivität stimmten in ihren absoluten Extinktionen sehr gut mit den früheren Ergebnissen überein.

Allen Enzymen gemeinsam ist der Anstieg der Aktivität von nahezu 0 bei 110 h bis 140 h nach Eiablage (Abb. 12). Zu diesem Zeitpunkt verlassen die Larven das Futter und treten in eine Migrationsphase ein, die bis zur Pupariumbildung (151 h nach Eiablage) andauert. In diesem 11-stündigen Zeitintervall werden charakteristische Unterschiede im Aktivitätsverlauf der jeweiligen Enzyme deutlich: Während die Aminotransferase in ihrer Aktivität abfällt, und auch in den ersten 10 h nach Pupariumbildung kaum mehr nachweisbar ist, steigt die Aktivität der GM-P-Isomerase auch nach der Pupariumbildung noch an. Die N-Acetylase zeigt währenddessen bis zum Zeitpunkt der Ecdysonausschüttung (146 h nach Eiablage) einen der Aktivität der Aminotransferase parallelen Abfall. In den darauffolgenden 5 h bis zur Pupariumbildung kommt es zu einem erneuten Anstieg bis zur Maximalaktivität, die über die nächsten 10 h noch weitgehend beibehalten wird.

3) Einbau radioaktiver Vorstufen in Glucosamin-Metabolite in explantierten Speicheldrüsen

Durch den Nachweis von drei Enzymen des Glucosamin-Stoffwechsels wurde es sehr wahrscheinlich, daß die Synthese von UDPNACHexosaminen in Speicheldrüsen abläuft. Da Phosphatester ebenso wie UDP-Zucker die Zellmembran i.A. nicht passieren, war auch nicht zu erwarten, daß diese Metabolite aus der Hämolymphe bzw. dem Fettkörper in die Speicheldrüsen oder umgekehrt transportiert würden, so daß auch aus diesem Grund eine endogene Synthese der UDPNACHexosamine geradezu

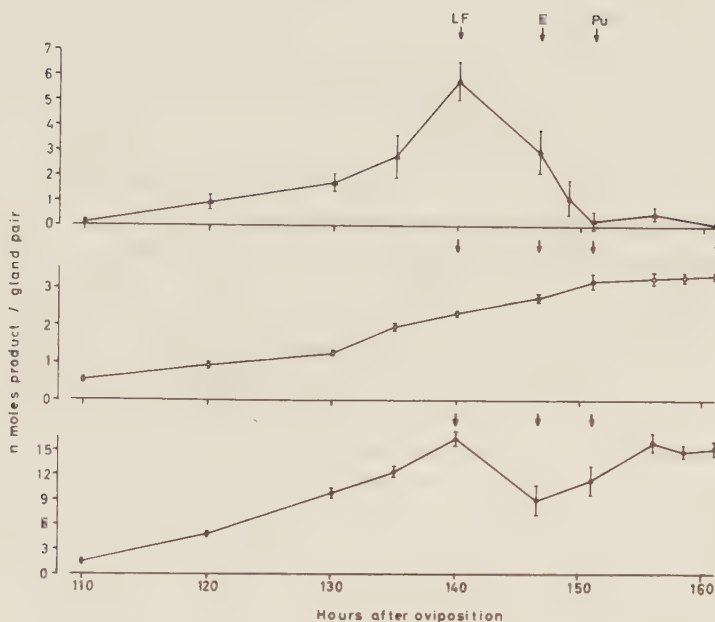


Abb. 12

Abhängigkeit der Aktivitäten von Glu-NH₂-F-6-P-Aminotransferase (oben, ▲), Glucosamin-Phosphat-Isomerase (mitte, ○) und Glucosamin-Phosphat-Acetyltransferase (unten, ●) in Speicheldrüsenhomogenaten vom Entwicklungsstadium (Abszisse, h nach Eiablage).

Jeweils Standardansätze. Mittelwerte aus drei bis sechs unabhängigen Experimenten $\pm$ S.E.M.

LF = Verlassen des Futters; E = Ecdysonausschüttung;

Pu = Pupariumbildung.

gefordert werden mußte. Wie oben gezeigt (vgl. Tab. 5), konnte in Drüsenhomogenaten die Synthese dieser Metabolite jedoch nicht nachgewiesen werden. Es wurde daher angenommen, daß durch die Homogenisation der normale Ablauf der Reaktionskette gestört war, und eine intakte Zellstruktur erforderlich wäre.

a) Eignung verschiedener Kulturmedien für die Funktionsintegrität der Speicheldrüsen

Eine erfolgsversprechende Inkubation isolierter ganzer Drüsen setzt die Verwendung eines Mediums voraus, das die Struktur und Funktion der Drüsen optimal aufrechterhält. Es wurde daher zunächst die Funktionsfähigkeit der Drüsen in verschiedenen, in der Literatur beschriebenen Medien durch Einbau von markiertem Leucin in TCA-fällbares Protein untersucht, da die Proteinsynthese als empfindliches Maß für die Integrität eines Gewebes gilt. Tabelle 9 enthält eine Übersicht über die Einbauraten von ^3H -Leucin in Protein von Speicheldrüsen in verschiedenen Medien.

Der Vergleich zeigt, daß in dem von Poels (37) angegebenen Medium die Funktionsfähigkeit der Drüsen am längsten aufrechterhalten wird. Während in diesem Medium nach 4 h Vorinkubation noch 46 % der ursprünglichen Aktivität eingebaut werden, liegen die entsprechenden Werte der anderen Medien bei nur 1-2 %. Das von Poels beschriebene Medium erschien deshalb für die geplanten Untersuchungen am geeignetsten. Es wurde allerdings in etwas modifizierter Form (vgl. Material und Methoden) verwendet. Für die Einbauversuche wurden die Speicheldrüsen in Poels-Medium präpariert und nach Zusatz der markierten Substrate unter leichtem Schütteln inkubiert.

Tab. 9

Eignung verschiedener Medien für die Erhaltung der Proteinbiosynthese in explantierten Speicheldrüsen als Maß für Struktur- und Funktionsintegrität. Die Speicheldrüsen wurden aus Larven, die gerade das Futter verlassen hatten, präpariert und zwischen 0 und 4 h in dem jeweiligen Medium vorinkubiert. Dann wurden 25 μ Ci L-Leucin-4,5- 3 H/0,1 ml Inkubationsmedium zugesetzt und 1 1/2 h weiterinkubiert. Die Zahlenangaben sind Ipm/Drüsenpaar, die Werte in Klammern entsprechende Prozente.

Alle Medien enthielten Streptomycin-Sulfat und Penicillin G (je 100 μ g/ml) und wurden mit 1 N NaOH auf pH 6.9 eingestellt.

Medium	Dauer der Vorinkubation in h			
	0	1	2 1/2	4
TEG	742(100)	104(14)	31(4)	11(2)
TEG+ 200 mM Sucrose	807(100)	41(5)	23(3)	12(1)
Ephrussi-Beadle+ 640 mM Sucrose*	3180(100)	264(8)	92(3)	62(2)
Poels	290(100)	233(80)	142(49)	134(46)

* Sucrose-Einwaage nach Illmensee (77).

b) Experimentelle Strategie

Zu den Mucopolysaccharid-Vorstufen führen, wie das Reaktionsschema (Fig. 4) zeigt, zwei Wege:

1. Der als Hauptweg betrachtete zweigt von der Glycolysekette ab; sein Schlüsselenzym ist die Glu-NH₂-F-6-P-Aminotransferase mit ihrer typischen Feedback-Hemmung. Der Einbau von Radioaktivität aus ³H-markierter Glucose wird - abgesehen von dem Einfluß verschiedener Flußraten in der Glycolyse - hauptsächlich die Aktivität dieses Enzyms widerspiegeln.

Da der nur langsam abnehmende Einbau von ³H-Leucin in das Protein der explantierten Drüsen gezeigt hatte, daß diese noch eine zeitlang funktionell intakt blieben, war zu erwarten, daß wesentlich mehr Metabolite radioaktiv markiert würden, als in den oben geschilderten Versuchen mit Homogenatüberständen. Um diese leichter identifizieren zu können, wurde einem Teil der Ansätze gleichzeitig ¹⁴C-Uridin (Markierung im Uracil-Ring) zugegeben. Unter den experimentellen Bedingungen durften die H-6-Phosphate, GM-6-P und die NAcGM-Phosphate nur ³H-markiert sein, während die Fraktion der UDPHexosen und UDPNacHexosamine ³H- und ¹⁴C-Aktivität aufweisen sollte. Diese Versuche erlauben gleichzeitig eine Aussage über den Stoffwechsel des Uridins im Wege der Polysaccharid-Synthesen.

2. Der zweite Weg, von sicherlich untergeordneter Bedeutung, geht direkt vom Glucosamin aus. Dieses wird durch eine Glucosamin-Kinase (43, 70, 78-81) in Glucosamin-6-Phosphat umgewandelt (vgl. Fig. 4, 5). Durch Verwendung von ¹⁴C-Glucosamin als Substrat kann die Aktivität der N-Acetylase sowie der folgenden Enzyme indirekt untersucht werden. Bei der Interpretation wird aber zu berücksichtigen sein, daß je nach Aktivität von Aminotransferase und GM-P-Isomerase (Fig. 4, Reaktionen 1 und 4) der GM-6-P-Pool Schwankungen unterliegen kann, welche die spezifische Aktivität von ¹⁴C-GM-6-P beeinflussen.

c) Methodische Vorarbeiten

α) Identifizierung der gebildeten Metabolite

Abbildung 13 zeigt repräsentative Elutionsprofile (an DOWEX 1) zum Nachweis dieser beiden Stoffwechselwege. In den Fraktionen 1-14 wurden mit H_2O jeweils die Substrate eluiert. Im Versuchsansatz mit Doppelmarkierung (3H -Glucose/ ^{14}C -Uridin) war 3H -Aktivität in jenen Fraktionen vorzufinden, in denen GM-6-P, NAcGM-1-P bzw. -6-P und die Hexose-6-Phosphate eluiert werden (Abb. 13, oben, Mitte), ^{14}C -Aktivität dagegen in Fraktionen, die UMP enthalten, geringe Aktivität auch im Bereich von UDP und UTP. Doppelmarkierung war allein in der UDP-Zuckerfraktion zu finden, sowie in der "Zwischenfraktion", die neben Lactat und Pyruvat (vgl. II. 1) noch weitere, nicht identifizierte Substanzen enthält (Fraktionen 26-36). Werden die Drüsen mit ^{14}C -Glucosamin inkubiert (Abb. 13, unten), so ist das Elutionsprofil, abgesehen von der sehr viel geringeren Höhe der NAcGM-P- und H-6-P-Gipfel ähnlich demjenigen, das sich nach 3H -Glucose-Einbau im Doppelmarkierungsexperiment ergibt. Es fehlt erwartungsgemäß die Schulter im Bereich der UDP-Zucker, in der UDPG und UDPGal gefunden werden (siehe Abb. 13, oben).

Die einzelnen Fraktionen wurden nach der Säulenelution dünnenschichtchromatographisch weiter charakterisiert:

1. GM-6-P-Fraktion (Fraktionen 19-25):

Diese Fraktion wurde im System D untersucht. Auf den Autoradiogrammen war nur ein Fleck zu finden (Abb. 14, a), der im Ansatz mit Doppelmarkierung ausschließlich auf den Einbau von 3H -Glucose zurückzuführen war. Ein zweiter, ninhydrinpositiver Fleck bei $R_f = 0.38$, der nicht identifiziert wurde, zeigte weder nennenswerten Glucosamin-, noch Glucose- oder Uridin-Einbau. Im wesentlichen ist daher die Aktivität dieser Fraktion auf GM-6-P zurückzuführen.

2. NAcGM-Phosphate (Fraktionen 39-45):

Die Chromatographie im System E ergibt einen langgezogenen Fleck, der im Doppelmarkierungsexperiment ausschließlich 3H -markiert ist und auf NAcGM-1-P und -6-P zurückgeht. Ein dritter, deutlich weiter wandern-

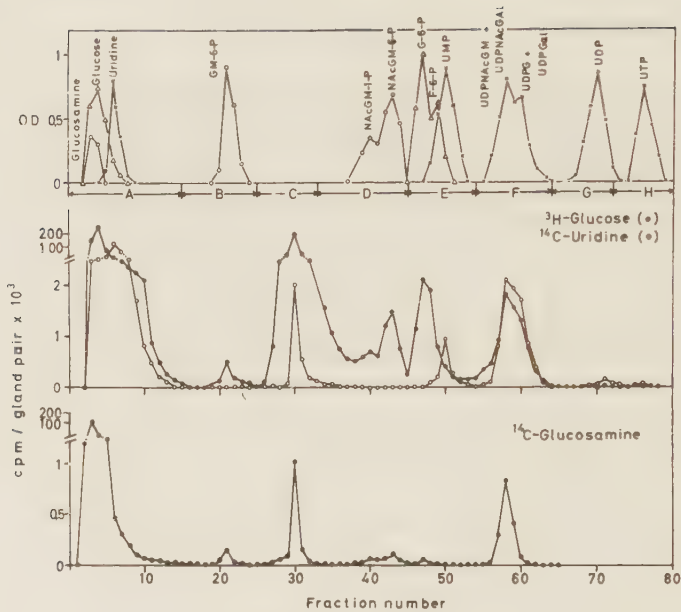


Abb. 13

Chromatographie von Substraten und Metaboliten der Mucopolysaccharid-Synthese an DOWEX 1x8 (HCOO⁻-Form).

Oben: Standardprofil.

Mitte: Metabolite nach Inkubation explantierter Speicheldrüsen mit 6-³H-Glucose (48.1 µCi) und U-¹⁴C-Uridin (5.2 µCi). Endvolumen 60 µl.

Unten: Gleiche Bedingungen, aber Inkubation mit U-¹⁴C-Glucosamin (1.96 µCi/60 µl).

Die Stufen des Elutionsgradienten (A-H) sowie die Bedeutung der Symbole im Standardprofil sind dieselben wie in Abb. 5.

Abb. 14



Autoradiographien von Chromatogrammen, die in den Systemen C (a), E (b) und B (c) entwickelt wurden: Explantierte Speicheldrüsen wurden in Poels-Medium (60 μ l Endvolumen) mit ^3H -Glucose (48.1 μCi) und ^{14}C -Uridin (5.2 μCi) 60 min inkubiert, und die Äthanolextrakte (80 %) an DOWEX 1x8 (HCOO^- -Form) chromatographiert.

(a) GM-6-P (Fraktionen 20-23; siehe Abb. 12, mitte).

(b) Die beiden NAcGM-Phosphate (Fraktionen 38-45; Abb. 12, mitte). Der 3. Fleck, oben, wurde nicht identifiziert.

(c) Die Hexose-6-Phosphate (Fraktionen 45-53; Abb. 12, mitte) mit dem Begleitfleck UMP und möglicherweise P_i .

Expositionszeiten 5-6 Tage.

der Fleck ($R_f = 0.7$; Abb. 14, b), der nur nach Inkubation mit ^3H -Glucose/ ^{14}C -Uridin erschien, war ausschließlich ^3H -markiert, wurde aber nicht näher untersucht. Das Verhältnis der ^3H -Markierung von NAcGM-1-P zu derjenigen von NAcGM-6-P lag in sämtlichen Ansätzen bei 0.3-0.4 (das Gleichgewichtsverhältnis ist 0.18; 57). Der ^{14}C -Glucosamin-Einbau war allerdings sehr schwach.

3. Hexose-6-Phosphate und UMP (Fraktionen 46-52):

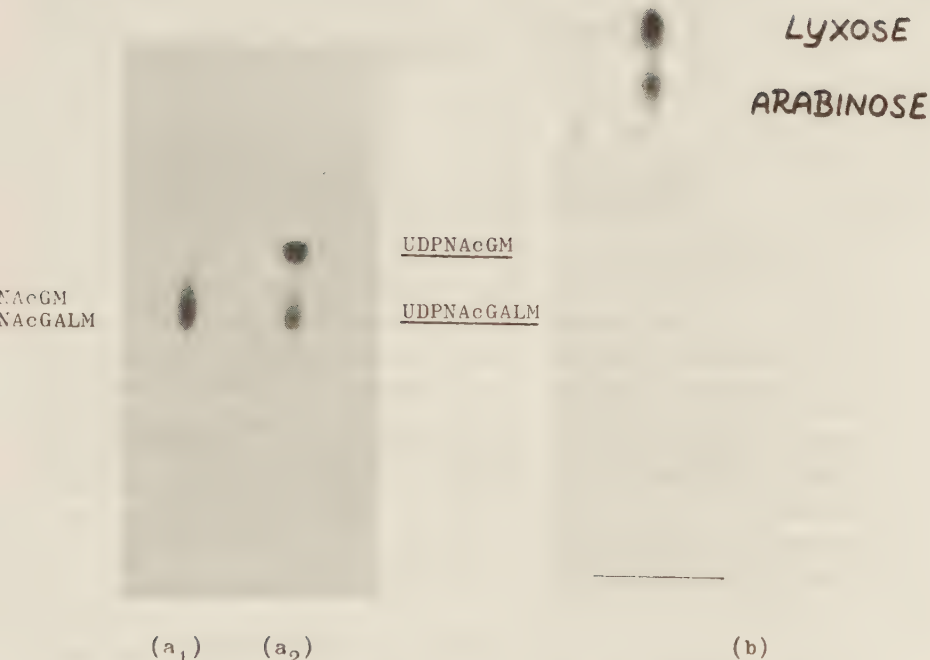
Die Fraktionen 46-52 (nach ^{14}C -Glucosamin-Einbau: 46-49) wurden zu einer Sammelfraktion vereinigt und zur Trennung von G-6-P und F-6-P im System B (Tab. 1) chromatographiert. Nach Inkubation mit ^3H -Glucose und ^{14}C -Uridin wurde daneben noch ein weiterer Fleck mit einem R_f -Wert von etwa 0.8 vorgefunden (Abb. 14, c). Dieser Fleck enthält neben ^{14}C -Aktivität, die auf UMP zurückzuführen ist, noch ^3H -Aktivität unbekannter Identität. Die exakte Quantifizierung von UMP in der H-6-P-Fraktion wurde aber in den Dünnschichtchromatographie-Systemen A_I und A_{II} vorgenommen, in denen der UMP-Fleck rein und ausschließlich ^{14}C -markiert ist. Die Einbauwerte stimmen in beiden Systemen gut überein und sind mit dem ^{14}C -Anteil des heterogenen UMP-flecks im System B vergleichbar.

4. UDP-Zucker (Fraktionen 55-64):

Nach Inkubationen von Drüsen mit ^{14}C -Glucosamin wird in den Fraktionen 55-60 radioaktives Material gefunden, das im Dünnschichtchromatographie-System A_I nur einen Fleck liefert (Abb. 15, a₁), während im System A_{II} eine Auftrennung in zwei Flecke erfolgt (Abb. 15, a₂). Diese Flecke wurden aufgrund ihrer R_f -Werte als UDPNacGM und UDPNacGALM bestimmt; ihre Identität ließ sich darüber hinaus durch den Befund bestätigen, daß nach Konvertierung der ^{14}C -Glucosamin-markierten Nucleotidzucker in ihre Pentoseanalogen (vgl. Material und Methoden) die Radioaktivität nach Chromatographie im System F in Flecken wiedergefunden wird, deren R_f -Werte für Lyxose bzw. Arabinose charakteristisch sind (Abb. 15, b). Die Bildung dieser Pentosen ist zu erwarten, wenn die Ausgangssubstanzen UDPNacGALM bzw. -GM gewesen sind.

Wurde den Drüsen während der Inkubation gleichzeitig ^3H -Glucose und ^{14}C -Uridin angeboten, so traten in den Fraktionen 55-64 neben UDP-Derivaten von NacGM und NacGALM noch diejenigen von Glucose und Galactose auf. Die Identifizierung und Quantifizierung der einzelnen Metabolite wurde in den Systemen A_I und A_{II} vorgenommen. Während im System A_I die UDPNacHexosamine von den UDPHexosen getrennt werden (Fig. 16, a), erfolgt im System A_{II} die Trennung der jeweiligen Epimeren, wobei allerdings die R_f -Werte von UDPNacGALM und UDPG identisch sind (Fig. 16, b).

Abb. 15



Autoradiographien von Chromatogrammen, die in den Systemen A_I (a₁) und A_{II} (a₂) und F (b) entwickelt wurden: Explantierte Speicheldrüsen wurden in Poels-Medium (60 µl Endvolumen) mit ¹⁴C-Glucosamin (1.96 µCi) 60 min inkubiert und der Äthanolextrakt (80 %) an DOWEX 1x8 chromatographiert.

(a₁, a₂) UDPNacHexosamin-Fraktion (Fraktionen 59-64; siehe Abb. 12, unten) einmal im System A_I und eine identische Probe im System A_{II} entwickelt.

(b) Die gleiche Probe (aber in 2-facher Menge) nach Konvertierung mit Ninhhydrin. Es entstehen die korrespondierenden Pentosen - Arabinose repräsentiert UDPNacGM, Lyxose UDPNacGALM.

Expositionszeiten: 3-4 Tage.

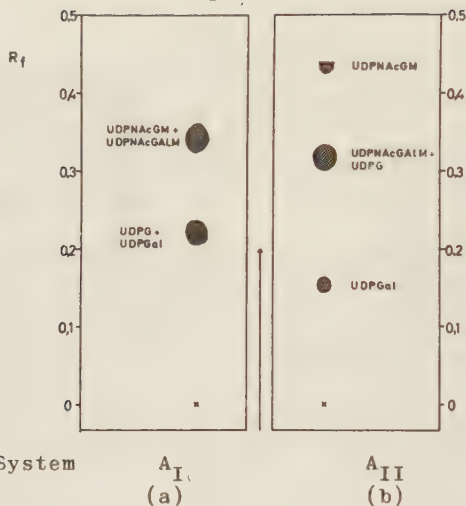


Fig. 16

Identifizierung der UDP-Zuckerfraktion nach ^3H -Glucose/ ^{14}C -Uridin-Einbau durch Dünnschichtchromatographie.

Am Start (x) wurden in (a) und (b) identische Proben aufgetragen; (a) wurde im System A_I , (b) im System A_{II} (Tab. 1) in Pfeilrichtung chromatographiert.

Die Verwendung beider Systeme für eine zweidimensionale Chromatographie (46) erwies sich als unvorteilhaft, da das Auswaschen des ersten Laufmittels (Essigsäure/LiCl) mit TRIS/Methanol vor der Chromatographie in der zweiten Dimension Substanzverluste mit sich brachte, und die unvollständige Beseitigung von LiCl die Bildung diffuser und langgezogener Flecke zur Folge hatte. Es wurde daher auf zweidimensionale Chromatographie einer Probe verzichtet; statt dessen wurden identische Proben der UDP-Zuckerfraktion getrennt in den Systemen A_I und A_{II} chromatographiert. Wie aus Figur 16 zu ersehen ist, können auf diese Weise die Anteile der vier Zucker ebenfalls ermittelt werden. Im System A_{II} liegen UDPNacGM und UDPGal nach dem Lauf bereits rein vor. Die Aktivität von UDPNacGALM läßt sich als Differenz zwischen der Aktivität von UDPNacGM und der Gesamtaktivität des UDPNacGM/UDPNacGALM-Flecks im System A_I ermitteln. Damit ist dann auch der Aktivitätsanteil von UDPG im UDPNacGALM/UDPG-Mischfleck im System A_{II} zu berechnen.

Sowohl nach ^{14}C -Glucosamin- wie auch nach ^3H -Glucose/ ^{14}C -Uridin-Inkubation erscheinen nach Chromatographie der Nucleotidzuckerfraktion im System A_{II} unter UV-Licht zwei weitere dunkle Flecke mit R_f -Werten von 0.59 und 0.66. Sie wiesen keine nennenswerte Radioaktivität auf, und wurden deshalb nicht identifiziert.

5. UDP und UTP (Fraktionen 67-73 und 74-79):

Die Nucleotide UDP und UTP werden vollständig getrennt von der Säule eluiert (siehe Abb. 13, oben). Die Untersuchung der jeweiligen Fraktionen im System A_I ergab keinen Hinweis auf irgendwelche Fremdaktivitäten. UTP war in den meisten Fällen nur sehr schwach markiert.

β) Zeitabhängigkeit des Einbaus von ^3H -Glucose und ^{14}C -Uridin in explantierten Speicheldrüsen

Wurden Speicheldrüsen in Poels-Medium in Gegenwart von ^3H -Glucose und ^{14}C -Uridin inkubiert, so war ein schneller Einbau der beiden Isotope in Metabolite des Glucosamin-Stoffwechsels zu beobachten (Abb. 17). Bei der Betrachtung der Einbaukinetiken fällt als erstes auf, daß ein Teil der Kurven nach ziemlich kurzer Zeit (20-60 min) in ein Plateau übergeht. Daß dies auf eine Abnahme von Enzymaktivitäten zurückgeht, ist äußerst unwahrscheinlich, da die oben beschriebenen Versuche gezeigt hatten (Tab. 9), daß auch nach 1-stündiger Vorinkubation der Drüsen im Poels-Medium in den folgenden 1 1/2 h der Weiterinkubation noch 80 % der ursprünglichen Proteinbiosynthese gemessen werden. Vielmehr muß der Zeitpunkt der Abflachung als derjenige angesehen werden, zu dem die internen "Pools" der Vorstufen, insbesondere Glucose bzw. Uridin mit der radioaktiven Substanz gesättigt sind.

Der Verlauf des Einbaus von ^3H -Aktivität in die H-6-Phosphate läßt erkennen, daß der Pool dieser Metabolite als erster (20-30 min nach Beginn der Inkubation) ein Plateau erreicht (Abb. 17, a), wobei sich das Verhältnis der Markierung von F-6-P und G-6-P auf einen Wert von ungefähr 0.4 (Gleichgewichtsverhältnis: 0.52) einstellte. Der Pool der Uridinnucleotide wurde dagegen etwas langsamer gesättigt (Abb. 17, d). Mit zunehmendem Phosphorylierungsgrad ($\text{UMP} \rightarrow \text{UTP}$) war der Zeitpunkt der Sättigung weiter hinausgezögert. Während bei UMP 45 min nach Beginn der Inkubation bereits 94 % der nach 90 min vorgefundenen Radioaktivität erreicht

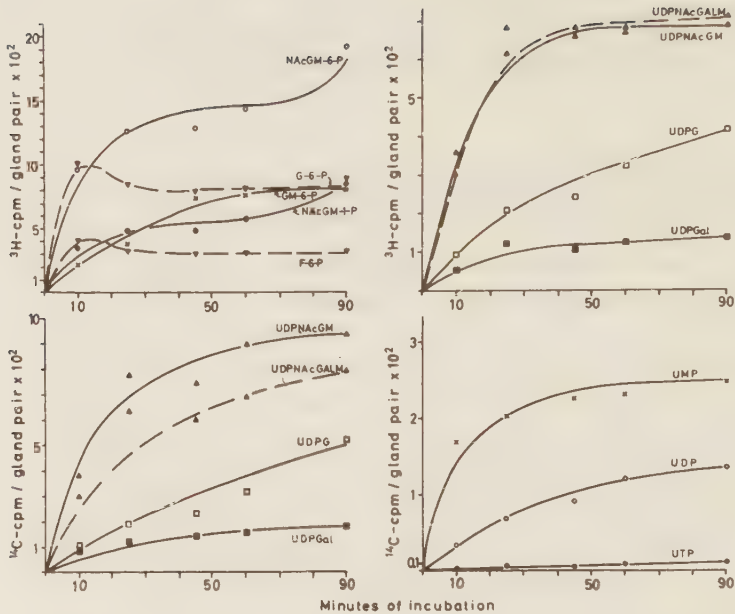


Abb. 17

Zeitabhängigkeit des Einbaus von ^3H -Glucose (48.1 μCi) und ^{14}C -Uridin (5.2 μCi) (60 μl Endvolumen) in die in 80 % Äthanol löslichen Metabolite, welche aus explantierten Speicheldrüsen von *D. virilis*-Larven (140 h nach Eiablage) isoliert wurden. Werte aus jeweils einem Versuch.

Die dünnschichtchromatographische Charakterisierung und Quantifizierung der von einer DOWEX 1x8 Säule (HCOO^- -Form) eluierten Gipfelfraktionen erfolgte entsprechend den Angaben im Text.

waren, lagen die entsprechenden Werte für UDP bei 78 % und für UTP bei 57 %. Der Einbau von ^{14}C -Uridin in UTP schien auch nach 90 minütiger Inkubation noch keinen Sättigungswert erreicht zu haben. Diese, im Vergleich zur schnellen Sättigung des H-6-P-Pools beobachtete zeitliche Verschiebung äußerte sich auch im Einbau von ^{14}C in die UDP-Glucosamin-Metabolite: Hatte der Einbau von ^3H -Glucose in GM-6-P und die UDPNacHexosamine zwischen 60 und 90 min ein beinahe konstantes Niveau erreicht (Abb. 17, a,b), so war für den Einbau von ^{14}C -Uridin in die UDPNacHexosamine im gleichen Zeitraum noch ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen (Abb. 17, c).

Ähnlich verhielten sich auch UDPG und, in schwächerem Maße, UDPGal, die über einen anderen Stoffwechselweg (vgl. Reaktionsschema, Fig. 4) synthetisiert werden. Interessanterweise ist aber dieser Anstieg sowohl beim Einbau von ^3H -Glucose (Abb. 17, b) als auch ^{14}C -Uridin (Abb. 17, c) festzustellen. Dies spricht dafür, daß neben dem UTP-Pool auch derjenige des Glucose-1-Phosphats (G-1-P), des zweiten Substrats für die Bildung von UDPG, im Beobachtungszeitraum nicht gesättigt wird. Daraus wäre zu folgern, daß die eingesetzte ^3H -Glucose über G-6-P stärker in F-6-P als in G-1-P umgewandelt wird. Allgemein würde das bedeuten, daß nicht die Sättigung der ersten Vorstufe - durch Einstrom von Glucose aus dem Medium in die Drüsen - limitierend ist, sondern ein enzymatischer Schritt auf dem weiteren Syntheseweg zu den UDPHexosen.

Inwieweit das abweichende Verhalten der NacGM-Phosphate, deren ^3H -Aktivität zwischen 60 und 90 min anscheinend noch einmal zunimmt (Abb. 17, a), signifikant ist, kann nicht mit Bestimmtheit angegeben werden. Da die Einbaukinetik nicht im Vordergrund des Interesses stand, wurde für jede der gewählten Inkubationszeiten nur eine Messung ausgeführt. Während des gesamten Untersuchungsintervalls betrug das Verhältnis des ^3H -Einbaus in den 1-Phosphatester zu demjenigen in den 6-Phosphatester 0.3-0.4 (Gleichgewichtsverhältnis: 0.16-0.18).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß sich in den explantierten Speicheldrüsen nach einem Zeitraum von längstens 45-90 min bei der Mehrzahl der Glucosamin-Metabolite eine konstante, oder zumindest kaum mehr steigende Radioaktivität eingestellt hatte. Deshalb wurde in der Folge als Standard-Inkubationsintervall 60 min gewählt. Streng genommen müßte man die Sättigungskinetik in jedem Altersstadium erneut prüfen. Durch die Wahl einer Inkubationszeit von 60 (anstatt 45) min erfolgte aber eine gewisse Absicherung dagegen, daß in einem anderen Stadium die Pools vielleicht langsamer gesättigt wurden.

4) Ontogenie der Synthese von Glucosamin-Metaboliten

Die Untersuchung der in vitro-Aktivität von Enzymen des Glucosamin-Stoffwechsels hatte gezeigt, daß im Zeitraum zwischen dem Verlassen des Futters und der Pupariumbildung die Aktivität der Aminotransferase bis unter die Nachweisgrenze zurückgeht, die Aktivität der GM-P-Isomerase dagegen erhalten bleibt, und in der Vorpuppe sogar ein Maximum erreicht (Abb. 12). Während somit in der Larve die Synthese von GM-6-P von zwei Enzymen katalysiert wird, erfolgt sie in der Vorpuppe nur noch mit Hilfe eines dieser Enzyme. Da außerdem die Aktivität der N-Acetylase vor der Pupariumbildung vorübergehend vermindert ist (Abb. 12), kann angenommen werden, daß in den Stunden vor und nach der Pupariumbildung die Syntheserate der verschiedenen Glucosamin-Metabolite einer stadienspezifischen Veränderung unterworfen ist.

Dies wurde durch Inkubation von Drüsen aus Tieren genau definierten Alters mit ^3H -Glucose, ^{14}C -Uridin und ^{14}C -Glucosamin untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 18 und 19 dargestellt. In der Tat vermindert sich der Einbau von ^3H -Glucose und ^{14}C -Uridin in Glucosamin-Metabolite im Zeitraum zwischen dem Verlassen des Futters und der Pupariumbildung in z.T.

drastischer Weise, wobei für die H-6-Phosphate und die NAcGM-Phosphate minimale Einbauwerte zum Zeitpunkt der Ecdysonausschüttung verzeichnet werden (Abb. 18, a), während alle anderen Metabolite ihr Minimum zum Zeitpunkt der Pupariumbildung erreichen (Abb. 18, a,b,c).

Der Einbau der markierten Substrate war bei den UDP-Zuckern (Abb. 18, b und c) zum Zeitpunkt der Pupariumbildung auf 10-40 % des Ausgangswertes gesunken, bei allen anderen Metaboliten dagegen nur auf minimal 53 % (Tab. 10). Der Abfall war bei UDPNAcGM und UDPNAcGALM besonders steil. Dieser Unterschied ist überraschend, da sich alle Vorstufen im Großen und Ganzen sehr ähnlich verhalten. Es wäre als erstes zu fragen, ob eine Vergrößerung des endogenen UTP-Pools für die Abnahme der Radioaktivität in den beiden UDPNAcHexosaminen verantwortlich gemacht werden kann. Diese würde im Falle des ^{14}C -Einbaus die spezifische Aktivität des UTP verringern und damit zu der beobachteten Abnahme der Aktivität in der UDPNAcHexosamin-Fraktion führen. Die Vergrößerung des UTP-Pools könnte durch vermehrte Synthese bei gleichbleibendem Verbrauch, oder durch geringeren Verbrauch bei gleichbleibender Synthese hervorgerufen sein. Die Abnahme des ^{14}C -Uridin-Einbaus in UMP und UDP sowie die leichte Zunahme in UTP vor der Pupariumbildung (Abb. 18, d) könnten für eine solche Interpretation sprechen. Daß sie dennoch nicht zutrifft, geht aus den Ergebnissen der Abbildung 18, b hervor: Der Einbau von ^3H -Glucose in die UDPNAcHexosamin-Fraktion zeigt nämlich die gleich starke Abnahme, deutlich abweichend vom ^3H -Einbau in die übrigen Verbindungen.

Aus diesem Grund ist es eher wahrscheinlich, daß die Synthese der beiden UDPNAcHexosamine spezifisch gedrosselt wird. Das hätte zur Folge, daß UTP, das mit NAcGM-1-P in einer von der UDP-N-Acetylglucosamin-Pyrophosphorylase katalysierten Reaktion zu UDPNAcGM reagiert (vgl. Reaktionsschema, Fig. 4, Reaktion 6), sich anhäuft, was durch den Anstieg der Radioaktivität im UTP auch angedeutet wird (Abb. 18, d). Diese Akkumulation

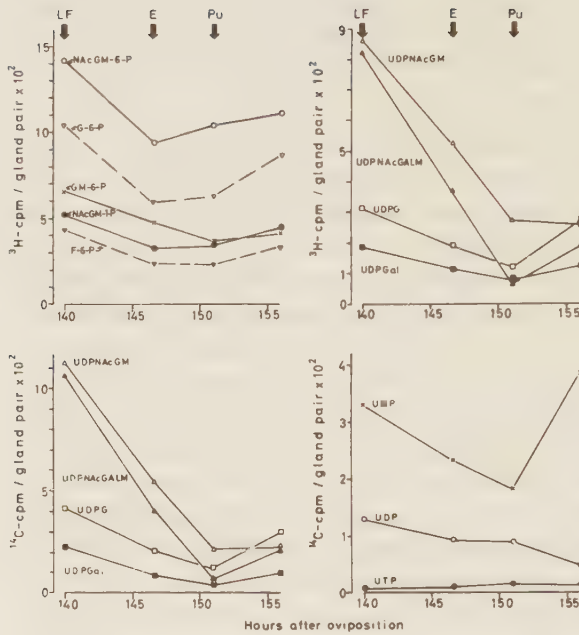


Abb. 18

Stadienabhängigkeit des Einbaus von ^3H -Glucose (48.1 μCi) und ^{14}C -Uridin (5.2 μCi) (Endvolumen: 60 μl) in die in 80 % Äthanol löslichen Metabolite, welche aus explantierten Speicheldrüsen von *D. virilis* nach 60 min Inkubation isoliert wurden. Je Versuch wurden 20 Speicheldrüsenpaare inkubiert.

Mittelwerte zweier Inkubationen mit verschiedenem Tiermaterial (die Einzelwerte sind in Tab. 10 aufgeführt).

LF = Verlassen des Futters; E = Ecdysonausschüttung;

Pu = Pupariumbildung.

Tab. 10

Einbau von ^3H -Glucose (48.1 μCi) und ^{14}C -Uridin (5.2 μCi) (Endvolumen 60 μl) in die in 80 % Äthanol löslichen Metabolite, welche aus explantierten Speicheldrüsen von *D. virilis*-Larven verschiedener Altersstadien nach 60 minütiger Inkubation isoliert wurden.

Die dünnschichtchromatographische Charakterisierung und Quantifizierung der von einer DOWEX 1x8 Säule (HCOO^- -Form) eluierten Gipelfraktionen erfolgte entsprechend den Angaben im Text.

Die Daten sind in Ipm/Drüsenpaar angegeben und repräsentieren die Mittelwerte zweier Inkubationen mit verschiedenem Tiermaterial.

In jedem Versuch wurden 20 Drüsenpaare eingesetzt.

Stadium		Verlassen d. Futters	Ecdyson- ausschüttung	Puparium- bildung	Vor- puppe
nach Eiablage		140	146.6	151	156
		1.Exp./2.Exp.	1.Exp./2.Exp.	1.Exp./2.Exp.	1.Exp./2.
GN-6-P	^3H	678/637	524/426	410/320	399/42
cGM-1-P	^3H	428/621	354/301	339/346	487/40
cGM-6-P	^3H	1169/1659	951/927	937/1149	1247/98
G-6-P	^3H	844/1216	507/659	660/600	780/95
F-6-P	^3H	353/502	197/263	242/214	300/36
UDPG	^3H	249/376	134/244	141/93	277/26
	^{14}C	287/545	123/278	156/85	301/28
UDPGal	^3H	150/218	104/115	70/75	130/12
	^{14}C	203/239	79/88	40/27	102/95
LPNacGM	^3H	770/955	547/519	280/270	249/27
	^{14}C	1000/1254	563/518	251/181	237/21
PNacGALM	^3H	682/960	356/369	74/61	211/17
	^{14}C	836/1285	422/380	80/60	208/20
UMP	^{14}C	281/381	226/237	165/199	303/44
UDP	^{14}C	133/127	75/110	66/111	44/48
UTP	^{14}C	8/6	6/11	16/12	16/9

erreicht aber nicht das Ausmaß, das sich aus der drastischen Reduktion der UDPNacHexosamin-Synthese ergeben könnte. In diesem Zusammenhang ist zu bedenken, daß die Hauptverwendung von UTP in der RNA-Synthese liegt. Andererseits wird für UMP und UDP im gleichen Zeitraum eine Abnahme der ^{14}C -Markierung anstelle einer Zunahme beobachtet (Abb. 18, d). Die Markierung des UTP zeigt also eine gegenläufige Tendenz zur Markierung seiner Vorstufen, was wiederum für eine Verminderung des UTP-Verbrauchs spricht.

Dies zeigt, daß eine eindeutige Interpretation der Ergebnisse erst möglich ist, wenn die Poolgrößen der einzelnen Metabolite bekannt sind. Im Rahmen dieser Arbeit konnten derartige Bestimmungen nur sehr begrenzt durchgeführt werden. Unter Verwendung eines automatischen Aminosäureanalysators wurden zu den gleichen Zeitpunkten wie bei den Isotopenversuchen die Aminosäuren Glutamat (Glu) und Glutamin (Glu-NH_2), sowie die UDPNacHexosamine bestimmt. In dem Zeitraum bis zur Pupariumbildung wurde dabei generell eine Abnahme der Pools registriert (Abb. 20). Die Konzentrationsabnahme von Glutamin und Glutamat findet parallel mit der Abnahme der Glu-NH_2 -F-6-P-Aminotransferase-Aktivität (Abb. 12) statt. Somit wird zusätzlich zur Inaktivierung des Enzyms auch noch die Substratkonzentration verringert.

Die Veränderung der UDPNacHexosamin-Konzentration (Abb. 20) stimmt mit dem Verlauf des Einbaus in die Glucosamin-Metabolite grundsätzlich überein: einer Abnahme vor der Pupariumbildung folgt eine erneute Zunahme in den ersten 5 h des Vorpuppenstadiums. Das beweist, daß der Rückgang der Einbauraten in die beiden UDPNacHexosamine nicht auf eine Verdünnung der Radioaktivität durch Erhöhung der Pools zurückgeht, sondern eine echte Drosselung ihrer Synthese ausdrückt. Dieses charakteristische Verhalten von Abnahme und Anstieg spiegelt im wesentlichen auch die Veränderung der enzymatischen

Ausstattung für die GM-6-P-Synthese wider, nämlich die Inaktivierung der Aminotransferase bei allmählicher Erhöhung der GM-P-Isomerase-Aktivität (Abb. 12).

GM-6-P wurde in keinem der Läufe des Analysators nachgewiesen (Abb. 20). Die Position des Metaboliten im Elutionsprofil konnte zwar mit Hilfe von authentischer Substanz genau festgelegt werden, doch lag die Konzentration in den Extrakten offensichtlich unter der Nachweisgrenze. Auch andere Autoren berichten nur von Spuren an GM-6-P (43, 80, 81, 83, 84), welche sie meistens nur mit Hilfe radioaktiver Markierung nachwiesen. Es muß allerdings auch festgestellt werden, daß GM-6-P mit Ninhydrin wesentlich schwächer reagiert, als z.B. das Glucosamin (Verhältnis der Farbausbeuten ca. 1 : 5).

Da die Bildung von GM-6-P für die gesamte Reaktionskette geschwindigkeitsbestimmend ist, lassen sich durch die Messung des Einbaus von Glucose allein keine Aussagen über Veränderungen der Enzymkapazitäten bei den übrigen Reaktionsschritten gewinnen. Aus diesem Grund wurde zusätzlich zum Einbau von ^3H -Glucose und ^{14}C -Uridin auch der Einbau von ^{14}C -Glucosamin untersucht, da auf diese Weise der erste, geschwindigkeitsbestimmende Reaktionsschritt umgangen wird (Abb. 19). Zunächst ist festzustellen, daß ^{14}C -Glucosamin tatsächlich in GM-6-P eingebaut wurde. Da in parallel durchgeführten Versuchen ^{14}C -Fructose nicht in den Glucosamin-Stoffwechsel eingeschleust wurde, dürfte die Phosphorylierung des Glucosamins nicht auf eine unspezifische Hexokinase, sondern vielmehr auf die Anwesenheit der spezifischen Glucosamin-Kinase (EC 2.7.1.8) zurückgehen.

Interessant ist in diesen Versuchen der mit zunehmendem Alter der Larven ansteigende Einbau von ^{14}C -Glucosamin in die H-6-Phosphate (Abb. 19). Dieser Einbau geht auf die Aktivität der GM-P-Isomerase zurück, die in kataboler Richtung GM-6-P in F-6-P und NH_3 spaltet (vgl. Fig 4, Reaktion 4). Die Markierung der H-6-P-

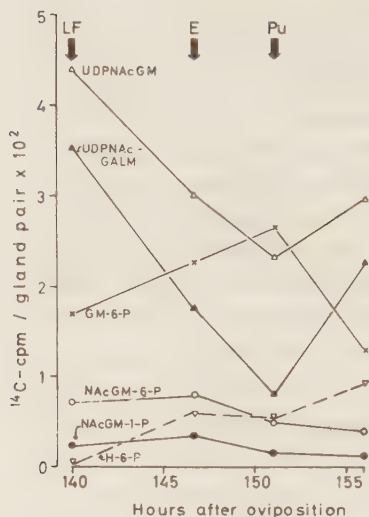


Abb. 19

Stadienabhängigkeit des Einbaus von ^{14}C -Glucosamin (1.96 μCi ; 60 μl Endvolumen) in die in 80 % Äthanol löslichen Metabolite, welche aus explantierten Speicheldrüsen von *D. virilis* nach 60 min Inkubation isoliert wurden. Je Versuch wurden 20 Drüsenpaare inkubiert. Mittelwerte zweier Inkubationen mit verschiedenem Tiermaterial (Einzelwerte siehe Tab. 11). LF = Verlassen des Futters; E = Ecdysonausschüttung; Pu = Pupariumbildung.

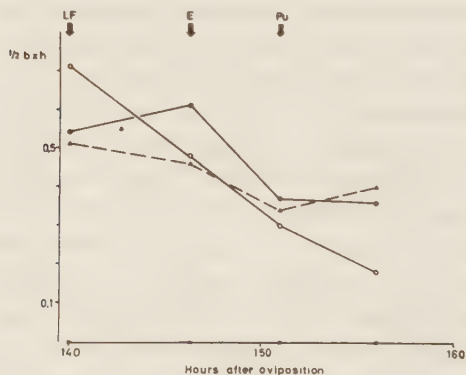


Abb. 20

Stadienabhängigkeit der Poolgrößen von GM-6-P (x), Glutamin (○), Glutamat (●) und UDPNacHexosamin (▲) in Speicheldrüsen von *D. virilis*. Auf der Ordinate sind Relativwerte angegeben, die aus den Chromatogrammen des Aminosäureanalysators nach dem Prinzip "Halbwertsbreite x Höhe" der jeweiligen Gipfel errechnet wurden. Mittelwerte aus mindestens zwei Versuchen.

Fraktion ist in Speicheldrüsen von Larven, die das Futter verlassen, noch kaum nachweisbar (Abb. 19, Tab. 11), nimmt aber bis 5 h nach Pupariumbildung in einem Maß zu, das der Zunahme der Aktivität der GM-P-Isomerase in vitro (Abb. 12) vergleichbar ist.

Der Verlauf der Radioaktivität im GM-6-P kann, muß jedoch nicht mit veränderter Aktivität der Glucosamin-Kinase erklärt werden. Der Anstieg des ^{14}C -Glucosamin-Einbaus in GM-6-P könnte auch auf einen Rückgang der GM-6-P-Bildung aus F-6-P und Glu-NH_2 - durch Abnahme der Glu-NH_2 -F-6-P-Aminotransferase-Aktivität - und damit auf eine Verkleinerung des GM-6-P-Pools zurückzuführen sein. Auch die vorübergehende Reduktion der N-Acetylase-Aktivität vor der Pupariumbildung (Abb. 12) dürfte zum Anstieg der Aktivität im GM-6-P beitragen. Die starke Abnahme des Einbaus von ^{14}C -Glucosamin in GM-6-P nach der Pupariumbildung ohne gleichzeitigen Rückgang des Einbaus von ^3H -Glucose (Abb. 18, a) ist allerdings ein starkes Indiz dafür, daß die Aktivität der Glucosamin-Kinase in diesem Zeitraum reduziert wird.

Der Einbau von ^{14}C -Glucosamin in die beiden NAcGM-Phosphate verändert sich nur wenig in dem betrachteten Zeitraum. Die Abnahme nach der Ecdysonausschüttung könnte durch den Rückgang des GM-6-P-Pools durch Umsatz in F-6-P und NH_3 mittels der GM-P-Isomerase gedeutet werden. Der Rückgang der UDPNAcHexosamin-Bildung sollte aber eher zu einer Akkumulation von NAcGM-Phosphat führen; dies ist jedoch nicht ausgeprägt.

Das Verhalten der UDP-Zuckerfraktion bekräftigt die schon durch ^3H -Glucose- und ^{14}C -Uridin-Einbau demonstrierte Abnahme vor der Pupariumbildung, gefolgt von einem Anstieg in den ersten 5 h danach (Abb. 19). Dies zeigt einmal mehr, daß in der Synthese der unmittelbaren Mucopolysaccharid-Vorstufen UDPNAcGM und UDPNAcGALM ein zweiter wichtiger Kontrollpunkt - nach der Synthese von GM-6-P - liegt, der möglicherweise unabhängig vom ersten gesteuert wird.

Tab. 11

Einbau von ^{14}C -Glucosamin (1.96 μCi ; 60 μl Endvolumen) in die in 80 % Äthanol löslichen Metabolite, welche aus explantierten Speicheldrüsen von *D. virilis*-Larven verschiedener Altersstadien nach 60 minütiger Inkubation isoliert wurden. Näheres siehe Legende zu Tabelle 10. Die Daten sind in ^{14}C -Ipm/Drüsenpaar angegeben und repräsentieren die Mittelwerte zweier Inkubationen mit verschiedenem Tiermaterial.

In jedem Versuch wurden 20 Drüsenpaare eingesetzt.

Stadium	Verlassen d. Futters	Ecdyson- ausschüttung	Puparium- bildung	Vor- puppen
nach Eiablage	140	146,6	151	156
	1.Exp./2.Exp.	1.Exp./2.Exp.	1.Exp./2.Exp.	1.Exp./2.E
GM-6-P	180/156	253/200	310/222	145/110
NAcGM-1-P	25/20	42/27	18/12	9/15
NAcGM-6-P	78/64	90/69	50/46	35/46
G-6-P	1/4	44/38	55/26	64/70
F-6-P	0/2	17/20	25/19	25/28
UDPNacGM	445/436	339/264	205/258	353/240
UDPNacGALM	391/315	213/138	71/90	250/202

5) Einbau radioaktiver Substrate in Sekretproteine explantierter Speicheldrüsen

Die Hauptaufgabe der Speicheldrüse im III. Larvenstadium von *Drosophila* ist die Synthese eines Mucoproteins, das wenige Minuten nach der Pupariumbildung durch die Mundöffnung ausgestoßen wird und, wenn es erhärtet ist, die Puppe an ihr Substrat heftet (85). Die Synthese dieses Sekrets erlischt im Zeitraum der Pupariumbildung (23, 37, 86, 87). Da Glucosamin ein Baustein dieses larvalen Sekrets ist (24-26), wäre zu erwarten, daß Sekretsynthese und Glucosamin-Stoffwechsel eng miteinander korreliert sind. Sowohl die Bestimmung der *in vitro*-Aktivitäten von drei Enzymen des Glucosamin-Stoffwechsels als auch die Einbauversuche in Glucosamin-Metabolite zeigen jedoch zwei Abschnitte der Stoffwechselaktivität auf diesem Weg, die durch den Zeitpunkt 150-152 h nach Eiablage (wenn das Puparium entsteht) voneinander abzugrenzen sind. Im Zeitraum der Pupariumbildung ist ein Minimum der Syntheserate aller betrachteten Metabolite festzustellen, in der Vorpuppe besteht dagegen eine generelle Tendenz zur erneuten Intensivierung dieses Stoffwechselweges. Es wird daher vermutet, daß in der Vorpuppe die Synthese eines neuen, spezifischen, Glucosamin-enthaltenen Sekrets noch unbekannter Funktion in Gang gesetzt wird. Elektronenmikroskopische Untersuchungen (87, 88) lassen im übrigen ebenfalls eine zweite Sekretionsphase für ein andersartiges Sekret vermuten, das im Gegensatz zum larvalen Mucoprotein keine PAS-Färbung mehr zeigt.

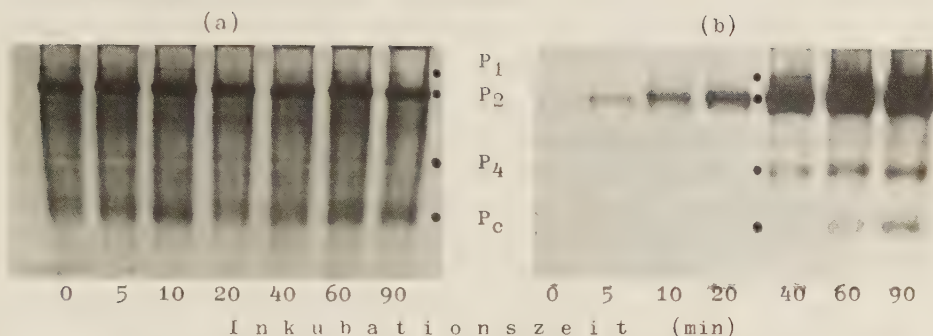
Der Einbau von radioaktiv markierter Glucose und von Glucosamin in das Sekretprotein von Larven und Vorpuppen sollte über dessen Synthese näheren Aufschluß geben. Zu dem Zweck wurden Drüsen von Tieren beider Altersstadien in Gegenwart markierten Substrats in Poels-Medium inkubiert, anschließend fixiert und für die Trennung der Proteine mittels Acrylamid-Gelelektrophorese vorbereitet.

Durch eine Proteinanalyse von ganzen Drüsen einerseits und von reinem Sekret andererseits konnten sekretspezifische Proteinbanden von cytoplasmatischen unterschieden werden (Kress, pers. Mitteilung). Die Unterscheidung gelingt leicht bei larvalen Drüsen, bei denen das Sekret im Lumen nach Fixierung zu einem zusammenhängenden Pfropf erstarrt, der anschließend von den umgebenden Drüsenzellen freipräpariert werden kann. In Drüsen, die aus Vorpuppen isoliert werden, bildet sich kein derartiger Sekretpfropf aus, so daß für diesen Fall noch nicht angegeben werden kann, welche Proteinbande sich von einem cytoplasmatischen, und welche sich von einem Sekretprotein herleitet.

Die Zunahme des Glucose-Einbaus in die Sekretproteine larvaler Speicheldrüsen mit der Inkubationsdauer ist in Abb. 21 dargestellt. Abb. 21, a zeigt das Proteinmuster. Es bleibt über den gesamten Inkubationszeitraum von 90 min unverändert. Dagegen läßt Abb. 21, b eine deutliche Zunahme des Einbaus von Glucose in bestimmte Proteinbanden erkennen. Die mit Coomassie-Blau am stärksten gefärbte Bande (P_2), welche auf eines der in den Drüsen synthetisierten larvalen Sekretproteine zurückzuführen ist, zeigt bereits nach 5 min eine Markierung, so daß zumindest für dieses Protein ein direkter - nicht über den generellen Intermediärstoffwechsel des Glucose-Kohlenstoffs verlaufender - Einbau wahrscheinlich ist. Zwei weitere Sekretproteine (P_1 und P_4) sind erst nach 20 bzw. 40 min markiert. Die verbleibende markierte Bande (P_c) ist vermutlich kein Sekret-, sondern ein zelluläres Protein. Die Tatsache, daß eine Reihe von Banden, welche durch Coomassie-Blau angefärbt werden, nicht radioaktiv markiert sind, unterstreicht, daß der Glucose-Einbau direkt, nicht dagegen über Metabolite wie Alanin, Glutamat, Aspartat usw. erfolgt ist.

Die Zunahme des Einbaus verläuft nicht kontinuierlich; vielmehr verstärkt sich der Einbau zwischen 20 und 40 min in alle bis dahin markierten Fraktionen sprunghaft. Dieser abrupte Anstieg könnte durch eine

Abb. 21



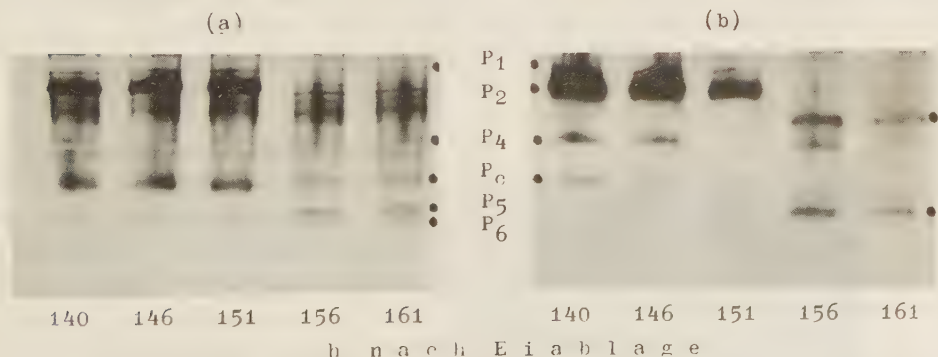
Elektrophoretische Trennung von Speicheldrüsenproteinen nach Inkubation der Drüsen mit ^{14}C -Glucose (2.5 μCi in 60 μl Endvolumen) während 0 und 90 min.

Acrylamidgel (Gradient: 3.8-5.2 %); Glycin-Acetat-Puffer (0.037 M, pH 4.0); Laufzeit: 5 h; Stromstärke: 8 mA.

Aufgetragen sind jeweils drei Drüsenpaare. Alter der Larven: 140 h nach Eiablage.

(a) Coomassie-Färbung. (b) Autoradiogramm desselben Gels nach dreiwöchiger Exposition.

Abb. 22



Elektrophoretische Trennung von Speicheldrüsenproteinen nach 60 min Inkubation explantierter Speicheldrüsen aus Larven bzw. Puppen unterschiedlicher Entwicklungsstadien mit ^{14}C -Glucose (2.5 μCi /60 μl Endvolumen).

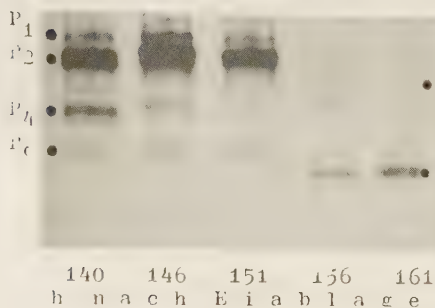
Acrylamidgel (Gradient: 3.8-5.2 %); Glycin-Acetat-Puffer (0.037 M, pH 4.0); Laufzeit: 5 h; Stromstärke: 8 mA.

Aufgetragen sind jeweils drei Drüsenpaare. (a) und (b) wie oben

verringerte Strukturintegrität der kultivierten Drüsen und damit erhöhter Membrandurchlässigkeit verursacht sein.

In Abb. 22 ist der Einbau von ^{14}C -Glucose in Larven- und Vorpuppenproteine dargestellt. Die Proteinmuster beider Stadien unterscheiden sich deutlich voneinander (Abb. 22, a). Die in der Larve synthetisierten Sekretproteine (P_1 , P_2 und P_4) sind in der Vorpuppe nur in stark abgeschwächter Form oder nicht mehr vorhanden, während in diesem Stadium wenigstens zwei neue Proteinfractionen auftreten (P_5 und P_6), die als ein spezifisches "Vorpuppenssekret" gedeutet werden (Kress, mündl. Mitteilung). Entsprechend verändert sich das Einbaumuster von Glucose (Abb. 22, b): Vor der Pupariumbildung sind vier Banden deutlich markiert, wobei die Intensität ihrer Markierung bis zur Pupariumbildung abnimmt. Dies ist nach allem, was wir jetzt über die Bildung dieser Proteine wissen (z.B. über die Aktivität der Aminotransferase) auch zu erwarten. Von den vier Banden zeigt nur eine (P_4) auch in der Vorpuppe (5 h nach Pupariumbildung) Radioaktivität. Zusätzlich erscheinen zwei bisher nicht markierte Banden (P_3 und P_5), von denen eine (P_5) mit der langsameren der beiden "Vorpuppenssekret"-Banden identisch ist.

Abb. 23



Elektrophoretische Trennung von Speicheldrüsenproteinen nach 60 min Inkubation explantierter Drüsen aus Larven bzw. Puppen unterschiedlicher Entwicklungsstadien mit ^{14}C -Glucosamin (2.7 $\mu\text{Ci}/60 \mu\text{l}$ Endvolumen). Acrylamidgel (Gradient: 3.8-5.2 %); Glycin-Acetat-Puffer (0.057 M, pH 4.0); Laufzeit: 5 h; Stromstärke: 8 mA. Aufgetragen sind jeweils 3 Drüsenpaare.

Gezeigt ist das Autoradiogramm nach einer Expositionszeit von 85 Tagen.

Die Einbauversuche mit ^{14}C -Glucosamin unterstreichen die mit ^{14}C -Glucose als Substrat gewonnenen Ergebnisse (Abb. 23). In beiden Fällen wird die Vermutung bestätigt, daß im Zeitraum zwischen dem Verlassen des Futters (140 h nach Eiablage) und der Pupariumbildung (151 h nach Eiablage) die Synthese des larvalen Mucopolysaccharids erlischt, und nach der Pupariumbildung mindestens ein neues, Glucosamin enthaltendes Sekretprotein (P_5), das spezifisch für die Vorpuppe ist, synthetisiert wird.

D) DISKUSSION

I. Die am Glucosamin-Stoffwechsel beteiligten Enzyme

In einer früheren Arbeit (28) wurde die wegen ihrer Stellung am Beginn der Reaktionskette und wegen ihrer allosterischen Eigenschaften als Schlüsselenzym des Glucosamin-Stoffwechsels geltende Glu-NH₂-F-6-P-Aminotransferase in *D. virilis* kinetisch und ontogenetisch charakterisiert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, in demselben Organismus einen Überblick über den Verlauf des gesamten Glucosamin-Stoffwechsels und seine entwicklungsbedingten Veränderungen zu gewinnen. Der Stoffwechsel wurde dabei in Drüsenhomogenaten anhand von Enzymaktivitäten, und in explantierten Drüsen mit Hilfe des Einbaus radioaktiver Substrate in Intermediär- und Endprodukte untersucht.

Die Versuche zur Aufklärung der metabolischen Reaktionsfolge zeigten, daß die Synthese der Kohlenhydratbausteine für die Mucoproteine über dieselben Reaktionen verläuft, die bei Pflanzen (43, 84, 89) und Tieren (36, 79, 81, 83, 90, 91) verbreitet nachgewiesen wurden (vgl. Reaktionsschema, Fig. 4). Als Reaktion, die am ehesten einer ontogenetischen Regulation unterliegen konnte, kam wiederum die Synthese von GM-6-P als dem ersten Schritt bei der Abzweigung von der Glycolyse in Betracht. GM-6-P kann durch zwei Reaktionen synthetisiert werden: In der ersten, von der Aminotransferase katalysierten, wird die Amidgruppe von Glu-NH₂ auf die Position 2 von F-6-P übertragen. Diese Reaktion ist de facto irreversibel und stellt die bevorzugte Syntheseroute dar, die im übrigen bei allen bisher untersuchten Organismen mit Ausnahme von Bakterien (64, weitere Lit. bei 28) durch UDPNacGM gehemmt wird. Die zweite Reaktion, bei der F-6-P durch NH₄⁺-Ionen mittels des Enzyms Glucosamin-Phosphat-Isomerase aminiert wird, ist auch physiologisch reversibel, wobei das Gleichgewicht auf Seiten der Bildung von F-6-P und NH₄⁺ liegt (36, 62). Die Aktivität der GM-P-Isomerase wurde zum ersten Mal

von Leloir und Cardini (36) in der Schweineleiere demonstriert, später an einer Anzahl weiterer Organismen, so u.a. in *E. coli* (62, 92), *B. subtilis* (93, 94), *Periplaneta americana* (95), *Musca domestica* (55) sowie in menschlichem Gehirn (96). In den meisten Arbeiten wurde dabei die katabolische Funktion des Enzyms betont, und nur in einigen Ausnahmen dessen Beitrag zur Synthese von GM-6-P diskutiert (55, 62). Synthetische Funktion wurde der GM-P-Isomerase auch im menschlichen Gehirn zugeschrieben (96), aber die relativ hohen K_m -Werte des Enzyms für $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (1.14×10^{-1} M, bzw. 1.6×10^{-2} M in Anwesenheit von NAcGM-6-P und Mn^{++}) lassen diese Hypothese zweifelhaft erscheinen, umsomehr deshalb, weil die Aktivität der Glutamin-Synthetase im Gehirn hoch ist, und dieses Enzym eine hohe Affinität gegenüber NH_4^+ hat (z.B. ist die K_m für NH_4^+ im Gehirn von Schafen 1.8×10^{-4} M - (97)-). Es ist deshalb nicht auszuschließen, daß die von den Autoren (96) beschriebene Bildung von GM-6-P aus F-6-P und NH_4^+ auf eine nicht-enzymatische Reaktion der beiden Substrate zurückzuführen ist, die bereits bei niedriger Temperatur ablaufen kann (76, sowie eigene Ergebnisse).

In Speicheldrüsen von *D. virilis* wurde die gleichzeitige Aktivität von Aminotransferase und GM-P-Isomerase innerhalb eines bestimmten Entwicklungszeitraums (110-151 h nach Eiablage; Abb. 12) nachgewiesen, der in der Folge von einem Stadium (151-161 h) abgelöst wird, in dem nur noch die GM-P-Isomerase aktiv ist. Wenn auch die Desaminierung von GM-6-P die von diesem Enzym bevorzugt katalysierte Reaktion ist, bedeutet dies nicht notwendigerweise, daß es keinen Beitrag zur Synthese der Drüsensekrete leisten könnte. Vorauszusetzen wäre dafür allerdings, daß GM-6-P laufend aus dem Gleichgewicht entfernt wird, und sich möglichst auch die weiteren Zwischenprodukte nicht anhäufen. Comb und Roseman (62) fanden beispielsweise, daß bei gleichzeitiger Anwesenheit der GM-P-Isomerase und der N-Acetylase sowie der Substrate beider Enzyme (vgl. Reaktions-

schema, Fig. 4) die Bildung von NAcGM-6-P in vitro stark begünstigt ist, während F-6-P und NH_4^+ nur in geringem Umfang entstehen. Nicht zuletzt aus diesem Grund wurde die Affinität der verschiedenen, an der Bildung von GM-6-P und dessen Folgeprodukten beteiligten Enzyme zu ihren Substraten untersucht, um die relative Bedeutung jedes Enzyms für den Glucosamin-Stoffwechsel abschätzen zu können.

Aminotransferase - Für die K_m -Werte der Aminotransferase in Speicheldrüsen (F-6-P: 1.1 mM; Glu-NH₂: 0.25 mM; siehe Abb. 9, a₁ und a₂) ergaben sich ähnliche Werte, wie sie in Totalhomogenaten gefunden worden waren (28). Bestätigt wurde auch die schwache Substrathemmung durch Glu-NH₂ in Konzentrationen ab 1 mM, sowie die Feedback-Hemmung durch UDPNAcGM, letztere allerdings bei höheren Konzentrationen des Inhibitors.

GM-P-Isomerase - Die Affinität dieses Enzyms für F-6-P ist mit einer Größenordnung von 10 mM (Abb. 9, c₁) relativ gering; die niedrigsten K_m -Werte wurden bei *Musca domestica* (K_m (F-6-P) = 36 mM; K_m (Ammonium-Ion) = 25 mM) gemessen (55). Bei *D. virilis* ist die Affinität zwar noch höher (K_m (F-6-P) = 10 mM; K_m (Ammonium-Ion) = 6.9 mM, Abb. 9, c₂), aber in der Konkurrenz um das Substrat F-6-P würde das Enzym dennoch der Aminotransferase unterliegen, bei der die K_m (F-6-P) 1.1 mM beträgt. Während der gleichzeitigen Aktivitätsphase beider Enzyme dürfte die GM-P-Isomerase deshalb von untergeordneter Bedeutung sein.

Das pH-Optimum der GM-P-Isomerase von *D. virilis* liegt mit 6.7 tiefer als die für andere Organismen mit 7.1-7.3 (55), 7.0-8.2 (62), oder 8.5-8.7 (96) angegebenen Werte. Es verschiebt sich in Gegenwart des Aktivators G-6-P ins Basische (Abb. 11, b), ein Verhalten, das das Enzym aus *Drosophila* mit dem aus *Musca domestica* (55) teilt. Für die desaminierende Reaktion hat die Anwesenheit von NAcGM-6-P die gleiche Wirkung: Dieser allosterische Effektor verschiebt das pH-Optimum der GM-P-Isomerase in

der Schweineniere aus einem breiten pH-Bereich von 7.0 bis 8.2 nach pH 8.8, wobei sich ein scharfes Maximum der Aktivität ausbildet (62). Diese möglicherweise auch physiologisch bedeutsame Eigenschaft kann gegenwärtig nicht gedeutet werden. Ob sich der intrazelluläre pH verschiebt, ja in welchem Bereich er überhaupt liegt, ist nämlich nicht bekannt; der Effekt würde jedenfalls bei gleichbleibendem pH-Wert eine Verringerung der Enzymaktivität bewirken.

Die Affinität des Enzyms sowohl gegenüber F-6-P als auch gegenüber NH_4Cl nimmt in Gegenwart von G-6-P zu, ein Befund, der sich bei einer Konzentration des Aktivators von 20 mM in einer Reduzierung des K_m -Werts für NH_4^+ auf die Hälfte (3.7 mM; Abb. 9, c_2) und für F-6-P auf ein Drittel (3.4 mM; Abb. 9, c_1) ausdrückt. Diese Daten sind fast identisch mit denen, die Benson und Friedman (55) für das G-6-P-aktivierte Enzym aus *Musca domestica* gefunden haben ($K_m(\text{NH}_4\text{Cl}) = 4.2$ mM; $K_m(\text{F-6-P}) = 4.8$ mM). Die Ähnlichkeit der beiden Enzyme wird noch dadurch unterstrichen, daß G-6-P gleichzeitig eine höhere V_{max} im Umsatz beider Substrate zur Folge hat.

G-6-P wirkt als Effektor nur in einer Richtung, der anabolen. Dagegen kann die GM-P-Isomerase in verschiedenen Organismen durch NAcGM-6-P in beiden Richtungen aktiviert werden (36, 55, 62, 96). NAcGM-6-P ist in seiner Funktion als Aktivator der Aminierung auch effektiver als G-6-P, das bei *Musca domestica* für eine mit NAcGM-6-P vergleichbar hohe Aktivierung in 10-facher Konzentration vorliegen muß (55). Eigene Ergebnisse zur NAcGM-6-P-Aktivierung des Enzyms von *D. virilis* weisen in dieselbe Richtung: für vergleichbare Enzymaktivitäten muß 8-10-mal soviel G-6-P wie NAcGM-6-P eingesetzt werden.

Weniger die G-6-P- als vielmehr die NAcGM-6-P-abhängige Aktivierung der GM-P-Isomerase, die bei physiologischer Konzentration des Effektors (weniger als 1 mM) wirksam ist, könnte für einen geregelten Ablauf der

Aminozuckersynthese bedeutsam sein. Da bislang eine katabole Funktion dieses Enzyms nicht auszuschließen ist, wäre bei gleichzeitiger Aktivität von GM-P-Isomerase und Aminotransferase (im Zeitraum zwischen 110 und 151 h nach Eiablage; Abb. 12) folgender Circulus vitiosus denkbar: In der von der Aminotransferase katalysierten Reaktion würde aus F-6-P und Glu-NH_2 GM-6-P entstehen, das über die GM-P-Isomerase wieder zu F-6-P und NH_4^+ rückreagieren würde (vgl. Reaktionsschema Fig. 4). NAcGM-6-P könnte nun - in analoger Weise wie das oben für G-6-P vermutet wurde - als Modulator der GM-P-Isomerase dergestalt wirken, daß es dessen Aktivität bei gleichbleibendem intrazellulären pH verringert. Damit träte NAcGM-6-P in vivo als negativer und nicht, wie auf den ersten Blick anzunehmen wäre, als positiver Effektor auf. Für diese Argumentation spricht weiterhin die Tatsache, daß Metabolite, die einen in der Reaktionssequenz vor ihrer Bildung liegenden Enzymschritt steuern, dies in aller Regel negativ anstatt positiv rückkoppelnd tun.

Wenn zwischen 140 und 151 h nach Eiablage die Aktivität der Aminotransferase steil abfällt, gewinnt die GM-P-Isomerase die Oberhand, um schließlich nach der Pupariumbildung als einziges Enzym, das GM-6-P aus F-6-P synthetisieren kann, noch aktiv zu sein.

N-Acetylase - Die Berechtigung, der GM-P-Isomerase in Speicheldrüsen von *D. virilis* anabolische Funktion zuzuschreiben, wird weiterhin aus dem Aktivitätsverlauf des GM-6-P acetylierenden Enzyms ("N-Acetylase") abgeleitet. Dieses Enzym nimmt zwar während eines kurzen Zwischenstadiums der larvalen Entwicklung (vom Zeitpunkt des Hochlaufens der Larven bis zur beginnenden Pupariumbildung, siehe Abb. 12) an Aktivität ab, ist aber etwa von dem Zeitpunkt an wieder maximal aktiv, von dem die GM-P-Isomerase alleine die Aminierung von F-6-P übernehmen kann. Wozu sollte die Aktivität des Enzyms dienen, wenn nicht dazu, von der GM-P-Isomerase angeliefertes GM-6-P zu NAcGM-6-P umzusetzen? Die ziem-

lich hohe Affinität der N-Acetylase (K_m für GM-6-P: 2.05 mM; Abb. 9, b) und die gegenüber der Aminotransferase 3 bis 4-fach so hohe V_{max} von 20 nMolen/Drüsenpaar x 45 min lassen das Enzym die eingangs geforderte Bedingung erfüllen, aus dem Gleichgewicht der GM-P-Isomerase-katalysierten Reaktion das vorliegende GM-6-P abzuziehen, und damit die Aminierung von F-6-P zu begünstigen. Hinzu kommt, daß die Acetylierungsreaktion auch energetisch stark begünstigt ist, sodaß bei laufender Nachlieferung von AcCoA der GM-6-P-Spiegel stets äußerst niedrig sein muß.

Für einen Vergleich der kinetischen Eigenschaften der N-Acetylase aus *D. virilis* mit denjenigen des Enzyms in anderen Organismen liegen nur wenige Daten vor. Danach hat das *Drosophila*-Enzym einen etwas höheren K_m -Wert für GM-6-P (2.05 mM; Abb. 9, b) als das Enzym aus *N. crassa* (K_m : 0.8 mM - (61) -) und aus dem Gehirn von Schafen (K_m : 0.45 mM - (98) -). Izumi (78) sowie Trujillo et al. (70) wiesen das Enzym neben einer Reihe weiterer Enzyme des Glucosamin-Stoffwechsels in Rattenleber bzw. Rinderschilddrüsen nach. Es wurde aber ebenso wenig charakterisiert wie das von Fristrom (80) an Imaginalscheiben von *D. melanogaster* nachgewiesene Enzym.

NACGM-P-Mutase - Weder charakterisiert noch ontogenetisch untersucht wurde die N-Acetylglucosamin-Phosphomutase in *D. virilis*. Aus Isotopenversuchen (Tab. 5) konnte die Anwesenheit dieses Enzyms allerdings abgeleitet werden. Das dabei erhaltene Verhältnis zwischen NACGM-1-P und -6-P liegt mit 0.24 (vgl. Tab. 5, die Spalten: +AcCoA; +AcCoA +UTP) in der Nähe des an *Neurospora* bestimmten Gleichgewichtsverhältnisses von 0.16 (57). In Isotopenversuchen wurde für die Rinderschilddrüse ein Verhältnis von 0.18 (81), für *Zea mays* von 0.33 (45) ermittelt. In Rattenleber, wo eine Vielzahl von am Glucosamin-Stoffwechsel beteiligten Enzymen untersucht wurde, ist die NACGM-P-Mutase mit der weitaus höchsten spezifischen Aktivität aller Enzyme ausgewiesen (78).

UDPNacGM-Pyrophosphorylase - Dieses Enzym konnte mit homogenisierten Drüsen nicht nachgewiesen werden. Es wäre denkbar, daß für seine Aktivität die Strukturintegrität der Drüsen erhalten sein müßte. Das wäre allerdings zunächst im Widerspruch zu Befunden von Izumi (78), der das Enzym in der löslichen Fraktion von Rattenleber fand. Nicht im Einklang mit Izumi sind allerdings die Arbeiten von Smith et al. (99) und Smith und Mills (100), wonach die Rückreaktion, die Bildung von UTP aus UDPNacGM und Pyrophosphat, von einer in der Kernfraktion der Rattenleber nachgewiesenen Pyrophosphorylase katalysiert wird.

II. Quantitative Beziehungen im F-6-P-Umsatz in vitro

Durch Verwendung markierter Vorstufen und chromatographischer Isolierung aller Metabolite in ein und demselben Inkubationsansatz (Abb. 5, Tab. 5) ließen sich Aussagen über den Ablauf der Einzelreaktionen in einem größeren Zusammenhang machen. Je nach Ab- bzw. Anwesenheit der für die Reaktionen nötigen Cofaktoren (AcCoA bzw. UTP) ergibt sich ein unterschiedliches Verhältnis von $^{14}\text{C-GM-6-P}$ zur Summen-Radioaktivität beider NAcGM-Phosphate (Tab. 12).

Tab. 12

Verhältnis des $^{14}\text{C-F-6-P}$ -Einbaus in GM-6-P zum $^{14}\text{C-F-6-P}$ -Einbau in die Summenfraktion der NAcGM-Phosphate. Versuchsansatz und der Berechnung zugrundeliegende Daten siehe Tab. 5.

	ohne Cofaktoren	+ AcCoA - UTP	+ AcCoA + UTP
$^{14}\text{C-GM-6-P}$			
$^{14}\text{C-NacGM-P}$	3.5	0.44	0.29

Da die radioaktive Markierung zum Zeitpunkt der Messung im Sättigungsniveau lag, gestatten es die Verhältniszahlen, daraus die relativen Konzentrationen der Metabolite zu berechnen. Hierdurch wird bestätigt, was schon bei der isolierten Betrachtung der Enzyme vermutet worden war, daß nämlich selbst bei extrem niedriger Konzentration das GM-6-P rasch acetyliert und dann weiter metabolisiert wird, was jeweils eine hohe Affinität der Folgeenzyme zu ihren Substraten voraussetzt. Das Verhältnis der GM-6-P- zur NAcGM-P-Markierung liegt bei ausreichendem Angebot an Cofaktoren zwischen 0.44 und 0.29, also deutlich zugunsten des N-acetylierten Produkts. Vergleichbare Daten können aus Literaturangaben errechnet werden, wenn die spezifischen Aktivitäten von Aminotransferase und N-Acetylase zueinander in Verhältnis gesetzt werden. Es ergeben sich für GM-6-P : NAcGM-(1+6)-P Werte von 0.58 für die Rinderschilddrüse (70) und 0.45 für Rattenleber (78), ganz ähnlich demjenigen Wert, der für D. virilis bei Anwesenheit von AcCoA bestimmt wurde (Tab. 12).

Daß bei gleichzeitiger Anwesenheit von AcCoA und UTP die Markierung der NAcGM-P-Fraktion nochmals um den Faktor 1.5 erhöht ist (Relation von 0.29 gegenüber 0.44, Tab. 12; vgl. auch Tab. 5), könnte darauf hindeuten, daß die Aminotransferase durch UTP aktiviert wird. In der Tat gibt es Befunde, die in diese Richtung weisen. So fanden Phelps et al. (101), daß die UDPNAcGM-Hemmung des Enzyms durch UTP teilweise aufgehoben wird. Dieser Befund könnte frühere Ergebnisse von Bates et al. (102) erklären, wonach Ratten, denen eine Orotsäure-haltige Diät verabreicht wurde, erhöhte UDPNAcGM-Werte aufweisen.

Die Isolierung der Metabolite durch Säulenchromatographie ermöglichte es, den Anteil des F-6-P, der während der Inkubation in den Glucosamin-Stoffwechsel ein- geht, relativ genau zu bestimmen, und ihn mit dem Anteil, der in die Glycolyse und andere Stoffwechselwege (Pentoseweg, Gluconeogenese, G-6-Phosphatase etc.) ab-

wandert, zu vergleichen. Die für den Ansatz mit AcCoA (siehe Tab. 5) ermittelten Daten sind:

1) eingesetzte ^{14}C -F-6-P-Aktivität	5.0×10^6 cpm
2) wiedergefunden als F-6-P + G-6-P	2.0×10^6 cpm
3) wiedergefunden als GM-6-P und seine Metabolite:	0.7×10^6 cpm

Differenz: eingesetzte (1) - wiedergefundene
(2 + 3) Aktivität 2.3×10^6 cpm

Maximal 2.3×10^6 cpm könnten durch die Glycolyse verbraucht sein, obwohl G-6-P in einer Reihe weiterer Reaktionen (s.o.) umgesetzt werden kann. Legt man diesen Maximalwert zugrunde, so machte der Umfang des Glucosamin-Stoffwechsels am F-6-P-Umsatz im Verhältnis zur Glycolyse etwa 30 % aus. Bei aller Skepsis, die gegenüber diesen Zahlen angebracht ist, deutet ein Vergleich mit entsprechenden Daten von Rattenleber (0.01 % der Glycolyserate) und der Haut neugeborener Ratten (15-20 %) (52) einen außergewöhnlich hohen Anteil des Glucosamin-Stoffwechsels am F-6-P-Umsatz in Speicheldrüsen an. Dies steht im Einklang mit der hohen spezifischen Aktivität der Glu-NH₂-F-6-P-Aminotransferase in den Speicheldrüsen (140 h nach Eiablage), die etwa 70-mal höher als in Rattenleber (103), und sogar 150-mal höher als in der Rinderschilddrüse (70) ist (28).

III. Hormonelle Regulation der Aminotransferase

Die Frage, wodurch die entwicklungsbedingten Aktivitätsveränderungen der einzelnen Enzyme (Abb. 12) verursacht sind, konnte zumindest für die Aminotransferase partiell geklärt werden. Wird nämlich das Häutungshormon Ecdyson 10-13 h vor dessen endogener Ausschüttung in Larven injiziert, so ist die Enzymaktivität in Speicheldrüsen, die 5 h nach der Injektion präpariert werden, zu 90-92 % unterdrückt (Tab. 6, b). Das Enzym wird nicht inaktiviert, wenn gleichzeitig mit der Hormoninjektion die Proteinsynthese gehemmt wird (58). Daraus wurde gefolgert, daß das Hormon nicht unmittelbar die

Synthese der Aminotransferase reprimiert, sondern indirekt, indem es die Synthese eines oder mehrerer Regulatorproteine, die das Enzym hemmen oder abbauen, induziert.

IV. Einbaustudien

Die Einbaustudien an explantierten Speicheldrüsen zeigten zunächst, daß sowohl Glucose als auch Glucosamin von diesem Gewebe autonom in Intermediär- und Endprodukte des Glucosamin-Stoffwechsels umgewandelt werden. Da alle erwarteten Zwischen- und Endprodukte auch radioaktiv markiert waren, konnte mit Hilfe der säulen- und dünnenschichtchromatographischen Techniken die metabolische Reaktionsfolge bis zu den unmittelbaren Vorstufen der Sekretproteine, den UDPNacHexosaminen, lückenlos aufgeklärt, und auch die markierten Sekretproteine selbst durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese nachgewiesen und getrennt werden. Die Elutionsbedingungen für die Chromatographie an DOWEX 1x8 (HCOO^- -Form) waren dabei so konzipiert, daß auch der am schwächsten gebundene Metabolit, GM-6-P, noch getrennt von den Frontfraktionen erschien, die die nicht phosphathaltigen Substrate enthielten (Tab. 4, a). Auf diese Weise wurde ein zweiter, möglicherweise verlustreicher, sicherlich aber zeitraubender Trennang an DOWEX 50, wie er in einigen anderen Arbeiten (80, 81, 83) nötig war, vermieden.

Die Vermutung, daß Glucosamin ein Bestandteil des larvalen Sekrets in Drosophila ist, war bereits von Kodani (24) und Ashburner und Blumenthal (26) geäußert worden. Sie wurde inzwischen dahingehend erweitert (86), daß das Sekret neben Glucosamin noch eine größere Menge Galactosamin enthielte. Beide, bisher nicht belegte Annahmen konnten in dieser Arbeit endgültig bestätigt werden. Das Verhältnis, in dem UDPNacGM und UDPNacGALM radioaktiv markiert sind, schwankt je nach Altersstadium zwischen einem Wert von 1 (140 h nach Eiablage; vgl. Abb. 18, 19 und Tab. 10, 11) bis 3-4 (151 h nach Eiablage;

Abb. 18, 19 und Tab. 10,11), möglicherweise bedingt durch unterschiedliche Poolgrößen. Es nähert sich also zur Zeit der Pupariumbildung (151 h) dem theoretischen Gleichgewichtswert, der von der UDP-N-Acetylglucosamin-4-Epimerase (EC 5.1.3.7) auf 2 Mole (104) bis 5 Mole (105) UDPNacGM pro Mol UDPNacGALM eingestellt wird.

Darüber hinaus läßt sich aus dem Befund, daß auch UDPG und UDPGal nach Einbau radioaktiver Glucose markiert werden, auf eine Glycogensynthese in den Drüsen schließen. Der Einbau von ^3H -Glucose in UDPG (Abb. 17, b), der als Maß für die Glycogensynthese dienen kann, nimmt zu Beginn der Inkubation (bis 45 min) weniger stark zu als der ^3H -Einbau in die meisten Glucosamin-Metabolite (Abb. 17, a und b). Er ist auch nach 90 min noch nicht abgeschlossen, wenn sich bei jenen Metaboliten die Sättigung der Pools mit ^3H bereits lange (30-45 min vorher) eingestellt hat. Das Verhältnis zwischen der UDPG und der UDPGal-Markierung, das von der UDP-Glucose-4-Epimerase (EC 5.1.3.2) eingestellt wird, liegt für den ^3H -Glucose und ^{14}C -Uridin-Einbau leicht unterschiedlich, und außerdem abhängig vom Alter der Tiere, zwischen 1.7 und 3 bis 3.5 (vgl. Abb. 17, b,c; Abb. 18, b,c; sowie Tab. 10). Das Gleichgewichtsverhältnis ist 4:1 (106).

Der Hexosamin-Stoffwechsel ist in *D. melanogaster* bereits einmal untersucht worden, und zwar in Imaginalscheiben (80). Neben Glucose und Glucosamin wurde dort zusätzlich NAcGM als Substrat angeboten und auch eingebaut. Jene Untersuchung beschäftigt sich jedoch hauptsächlich mit dem Reaktionsablauf als solchem und enthält kaum quantitative Daten. Mit Ausnahme der UDP-Hexosen wurden aber alle Metabolite, die in der Speicheldrüse vertreten sind, auch in den Imaginalscheiben markiert vorgefunden. Allerdings wurden nur bei Verwendung von ^{14}C -Glucosamin als Substrat, nicht aber bei ^{14}C -Glucose geringe Mengen an ^{14}C -Aktivität in der GM-6-P-Fraktion nachgewiesen. Diese Tatsache, zusammen mit dem Befund, daß ausgehend von unmarkiertem Glucosamin

(10-30 mM) eine verglichen mit einer äquimolaren Menge an Glucose 30-fach höhere Nettosynthese von UDPNacGM zu erzielen war, ließen Fristrom (80) eine Regulation des Hexosamin-Stoffwechsels auf der Stufe der Amino-transferase-katalysierten GM-6-P-Synthese postulieren. Der unmittelbare Nachweis einer Feedback-Hemmung der Aminotransferase durch UDPNacGM in *D. melanogaster* konnte von Fristrom allerdings nicht geführt werden; er gelang erst Kress und Enghofer (28) in Totalhomogenaten von *D. virilis*-Larven. In dieser Arbeit wird der Effekt auch für das aus Speicheldrüsen isolierte Enzym gezeigt.

Der Befund einer geringeren Nettosynthese von UDPNacGM ausgehend von Glucose (80) könnte seine Entsprechung in den vorliegenden Ergebnissen darin haben, daß trotz etwa 25-fach höheren Einsatzes von radioaktiver Glucose gegenüber Glucosamin (48.1 μ Ci : 1.96 μ Ci) die in die Glucosamin-Metabolite eingebaute Radioaktivität nur 8-mal so hoch ist (10000 3 H-dpm : 1200 14 C-dpm; vgl. Tab. 10 und 11). Es gilt jedoch zu bedenken, daß der endogene Glucosamin-Pool sehr viel kleiner sein dürfte als der Glucose-Pool, und Glucose in der Zelle außerdem in vielfacher Weise genutzt wird (über G-6-P eingeschleust in Glycolyse und Pentosephosphatzyklus, über G-1-P in die Glycogensynthese; vgl. Reaktionsschema, Fig. 4), weshalb ein unmittelbarer Vergleich der Einbauraten der beiden Vorstufen problematisch ist. Darüber hinaus wird bei der unphysiologisch hohen Konzentration von 10-30 mM Glucose, die Fristrom einsetzte, möglicherweise eine ebenfalls unphysiologisch hohe UDPNacGM-Konzentration induziert, wodurch die Aminotransferase dann effektiver gehemmt wird als bei physiologischen Konzentrationen des allosterischen Effektors im vorliegenden Markierungsexperiment.

Für eine kurzzeitige Regulation der UDPNacGM-Synthese dürfte die Feedback-Hemmung der Aminotransferase auch in Speicheldrüsen eine gewisse Rolle spielen, wenngleich eine Inhibitorkonzentration von ungefähr 0.4 mM erfor-

derlich ist, um das Enzym in vitro zu 50 % zu hemmen (Abb. 10). Die altersbedingten Veränderungen in der Synthese dieses Metaboliten, die sich u.a. durch einen stark unterschiedlichen Einbau von ^3H -Glucose (Abb. 18, b) und durch drastische Änderungen seiner endogenen Konzentration (Abb. 20) ausdrücken, sind mit dieser Hemmung allerdings nicht mehr zu erklären, sondern müssen ihre Ursache in jeweils unterschiedlichen Enzymaktivitäten bzw. -konzentrationen haben. Da der Einbau von ^3H -Glucose in die UDPNacHexosamine bei fortschreitender Entwicklung der Larven bis zur Pupariumbildung (140-151 h nach Eiablage; Abb. 18, b) parallel mit dem Pool dieser Fraktion (Abb. 20) abnimmt, kommt UDPNacGM als Feedback-Inhibitor ohnehin nicht mehr in Frage; vielmehr ist die zeitlich parallele Abnahme der Aminotransferase-Aktivität (Abb. 12) hauptsächlich für den Einbaurückgang verantwortlich zu machen. Für die später erfolgende, neuerliche Zunahme des Glucose-Einbaus in die UDPNacHexosamine in den ersten Stunden nach der Pupariumbildung kommt ausschließlich die GM-P-Isomerase in Betracht, da sie in diesem Stadium als einziges Enzym, das GM-6-P aus F-6-P synthetisieren kann, aktiv ist (Abb. 12). Somit bestätigt sich die aufgrund der in vitro-Ergebnisse geäußerte Vermutung, dieses Enzym könne in der Speicheldrüse analoge Funktion übernehmen. Aus der Tatsache des Einbaus von ^{14}C -Glucosamin in die H-6-P-Fraktion (Abb. 19), der ontogenetisch mit der in vitro gemessenen Aktivität der GM-P-Isomerase (Abb. 12) korreliert ist, läßt sich ableiten, daß diese Reaktion in vivo in beiden Richtungen abläuft. Dabei ist das Gleichgewicht, wie ein Vergleich des Einbaus in H-6-P und die UDPNacHexosamine nach der Pupariumbildung zeigt (Abb. 19), deutlich zugunsten der GM-6-P-Bildung verschoben.

Da neben dem Einbau von ^3H -Glucose auch derjenige von ^{14}C -Glucosamin und ^{14}C -Uridin in die unmittelbaren Sekretvorstufen in dem Entwicklungszeitraum von 140-151 h nach Eiablage rückläufig ist (Abb. 19, sowie Abb. 18, c), wurde neben der geschwindigkeitsbestimmenden

Bedeutung der Aminotransferase-Aktivität auf eine zusätzliche, entwicklungsbedingte Steuerung der UDPNac-Hexosamin- und damit der Sekretsynthese geschlossen. Sie dürfte auf der Stufe der UDP-N-Acetylglucosamin-Pyrophosphorylase erfolgen (vgl. Fig. 4, Reaktion 6). Mit dieser Forderung im Einklang stehen Ergebnisse von Gwinn und Stevenson (107), die an demselben Enzym im Flußkrebs *Orconectes obscurus* zwischen zwei Häutungen eine signifikante Abnahme der Aktivität finden. Speck et al. (71) postulieren aufgrund des Befundes, wonach nicht nur Glucose, sondern auch Glucosamin und NAcGM nach der Häutung des Flußkrebses signifikant stärker als vorher eingebaut werden, ebenfalls einen zweiten Regulationsschritt neben der Steuerung der GM-6-P-Synthese. In Anlehnung an Fristrom (80, s.u.) soll ihrer Meinung nach aber die Aktivität der Chitinsynthase reguliert werden. Da sie nur den Einbau in Chitin als Indikator herangezogen haben, UDPNacGM aber von ihrer Betrachtung ausgespart blieb, könnte sehr wohl auch in diesem Fall die Pyrophosphorylase das limitierende Enzym sein. Fristrom (80) postuliert aufgrund folgender Beobachtung die Existenz eines zweiten Regulationsschrittes auf dem Reaktionsweg zum Chitin: Die Imaginalscheiben in Larven von *D. melanogaster* sind zu einem Zeitpunkt, zu dem sie Chitin nachweislich noch nicht synthetisieren, bereits mit dem gesamten Enzymapparat ausgestattet, der sie befähigt, UDPNacGM zu bilden. In diesem Chitinvorläufer häuft sich dementsprechend nach Inkubation mit ^{14}C -Glucose, und verstärkt nach Inkubation mit ^{14}C -Glucosamin bzw. -NAcGM, ^{14}C -Aktivität an, ohne daß gleichzeitig ein signifikanter Einbau in die "äthanolunlösliche" Fraktion, in der u.a. Chitin enthalten sein sollte, nachweisbar wäre. In diesem Fall könnte die Chitinsynthase das limitierende Enzym sein. Physiologisch erscheint die Regulation auf der Pyrophosphorylase-Stufe ökonomischer, da sie das energiereiche Nucleotid UTP einspart, das damit vermehrt für die RNA-Synthese zur Verfügung steht.

Der ^3H -Glucose-Einbau in die Fraktion der H-6-Phosphate (Abb. 18, a) zeigt innerhalb des 11-stündigen Zeitintervalls bis zur Pupariumbildung einen möglicherweise bedeutsamen Rückgang auf etwa den halben Ausgangswert (vgl. auch Tab. 10). Dieser Befund ist deshalb bemerkenswert, weil sich in diesem Zeitraum die Synthesegeschwindigkeit der Mucopolysaccharid-Vorstufen, und damit der Abfluß aus der H-6-P-Fraktion jedenfalls in diese Richtung, drastisch vermindert. Deshalb wäre zu erwarten, daß die H-6-P-Fraktion zumindest gleichbleibend markiert sein sollte, sofern nicht Zufluß (aus Glucose oder Glycogen) oder Abfluß sich signifikant ändern. Da aus *in vitro*-Versuchen bekannt ist, daß die Aktivität der Hexokinase, die das Substrat ^3H -Glucose zu ^3H -G-6-P aktiviert, in diesem Zeitraum keinen altersbedingten Schwankungen unterliegt (108), muß die Ursache für den Rückgang des Einbaus andere Gründe haben. Man könnte daran denken, daß in Zusammenhang mit der Ausschüttung des Sekrets ins Drüsenlumen, die zeitlich etwa in die Mitte zwischen Ecdysonausschüttung und Pupariumbildung fällt (148.5-149 h nach Eiablage - (30) -), der Energiestoffwechsel via Glycolyse intensiviert wird, und ^3H -F-6-P vermehrt dorthin abfließt; eine Spekulation, die im übrigen auch von Kress (16) in Zusammenhang mit der Puffanalyse (in diesem Zeitabschnitt werden Puffs vorübergehend aktiv) angestellt worden ist.

Ein Vergleich der quantitativen Daten für die Beziehungen der Glucosamin-Metabolite zueinander mit denen anderer Arbeiten (43, 81, 84) wird dadurch erschwert, daß die Poolgrößen zum Teil berücksichtigt sind (81), zum Teil nicht (43, 84). Mit 75 % ist der nach ^{14}C -Glucosamin-Einbau gemessene Anteil der UDPNacHexosamin-Markierung an der Gesamtradioaktivität der Glucosamin-Metabolite in den Speicheldrüsen auffällig hoch (Tab. 13). Werte für die Rinderschilddrüse (81) und Maiswurzeln (43) sind 21 bzw. 24 %, für Getreidewurzeln bis zu 38 % (84). Die geringe Aussagekraft der Isoto-

pendaten allein erhellt aber aus der Tatsache, daß sich bei Berücksichtigung der Poolgröße im Fall der Rinderschilddrüse der entsprechende Anteil von 21 % auf 70 % erhöht.

Tab. 13

Prozentuale Verteilung der Radioaktivität in Glucosamin-Metaboliten der Äthanol-löslichen Fraktion von Speicheldrüsen nach 60 min Inkubation mit 48.1 μCi ^3H -Glucose bzw. 1.96 μCi ^{14}C -Glucosamin. Die Prozentangaben beziehen sich auf die jeweilige Radioaktivität, die in allen Glucosamin-Metaboliten zusammen gefunden wird, und die etwa 0.3 % (330000 Ipm/20 Drüsenpaare) der eingesetzten 48.1 μCi ^3H -Glucose und knapp 1 % (36000 Ipm/20 Drüsenpaare) der eingesetzten 1.96 μCi ^{14}C -Glucosamin entspricht.

Die Radioaktivitätswerte sind auf Zählausbeute (32 % bei ^3H , 80 % bei ^{14}C) und auf Wiederfindung von UDPNacGM (ca. 70 %, vgl. Tab. 4, b) korrigiert.

Das Alter der Larven, aus denen die Drüsen stammen, war 140 h nach Eiablage. Zwei Versuche mit verschiedenem Tiermaterial.

Metabolit	Anteil an der Gesamtmarkierung der GM-Metabolite	
	^3H -Glucose	^{14}C -Glucosamin
	1.Exp./2.Exp.	1.Exp./2.Exp.
GM-6-P	18 / 13	16 / 15.5
NacGM-(1+6)-P	43 / 47	9 / 8.5
UDPNacHM	39 / 40	75 / 76

Bei den genannten Geweben verhält sich die Markierung der NacGM-Phosphate etwa wie 1:1 zu derjenigen von UDPNacGM. Dasselbe Verhältnis wird bei D. virilis (140 h nach Eiablage) nach ^3H -Glucose-Einbau gefunden (Tab. 13). Stark zugunsten der UDPNacHexosamine verschoben (1:7; Tab. 13) ist es allerdings nach ^{14}C -Glu-

cosamin-Markierung. Diese Diskrepanz, die in beiden Versuchen mit verschiedenem Tiermaterial aufgetreten ist, kann zur Zeit nicht erklärt werden (Isotopeneffekt?).

GM-6-P wird in Übereinstimmung mit Arbeiten an anderen Organismen (43, 80, 81, 83, 84) gar nicht, oder nur in Spuren vorgefunden (vgl. auch Abb. 20). Meßbar radioaktiv markiert, wie im Fall der Speicheldrüse, wird es nur noch in der Rinderschilddrüse (81), dort mit einem relativen Anteil an der Gesamtmarkierung von etwa 9 % (D. virilis: ca. 15 %; vgl. Tab. 13). Es ist nicht auszuschließen, daß dort, wo GM-6-P nicht radioaktiv markiert nachgewiesen wird, die oftmals nötige nachgeschaltete Chromatographie an DOWEX 50 (s.o.) zu Substanzverlusten geführt hat, die sich für den Fall geringer Werte besonders stark auswirken. Gerade bei einem kleinen Pool, bei dem die Radioaktivitätsverdünnung gering ist, sollte nämlich markiertes GM-6-P zu finden sein. Nichtsdestoweniger ist dieser Befund von Spuren Mengen an GM-6-P und hohen Einbauwerten in die UDPNacHexosamine ein Hinweis auf die hohe Kapazität der Enzyme, die GM-6-P aus dem Gleichgewicht entfernen, und die Produktion von UDPNacHM katalysieren.

Welche physiologische Bedeutung der spezifischen Glucosamin-Kinase in den Speicheldrüsen zukommt, kann gegenwärtig noch nicht angegeben werden. Fristrom (80) fand, wie oben bereits ausgeführt, bei D. melanogaster eine Phosphorylierung sowohl von Glucosamin als auch von NAcGM. Bedeutsam könnten in diesem Zusammenhang Untersuchungen an Rinderschilddrüsen (81, 109) und Wurzelspitzen von Zea mays (43) sein, in denen sowohl Glucosamin als auch NAcGM in freier Form und nach radioaktiver Markierung mit z.T. hohem Anteil (NAcGM bis zu 20 % (81), ja sogar über 40 % -(43)-) an der Gesamtradioaktivität aller Glucosamin-Metabolite gefunden werden. In diesen Fällen scheint es sich um das Resultat eines hydrolytischen Abbaus des Thyreoglobulins (81, 109) bzw. der Glycoproteinfraktion (43) zu han-

deln. Da das Thyreoglobulin laufend gebildet wird, dürfte es auch einem ständigen Turnover unterliegen, bei dem NAcGM und Glucosamin in freier Form entstehen und durch Phosphorylierung erneut in die Mucoproteinsynthese eingeschleust werden. Für das Sekretprotein der Speicheldrüse ist ein solcher Abbau weniger wahrscheinlich, da das Mucoprotein, wie in elektronenmikroskopischen Untersuchungen vielfach gezeigt (87, 88), nur in einem begrenzten Zeitraum gebildet wird und zudem in Sekretgrana separiert vom Intermediärstoffwechsel vorliegt. Lediglich für die Zeit unmittelbar nach der Sekretausschüttung (bei *D. virilis*: 148.5-149 h nach Eiablage -(30)-) wäre es denkbar, daß etwa ein Rest nicht sezernierten Mucoproteins abgebaut wird, und somit Bestandteile für die Synthese eines neuen "Vorpuppensekrets" (s.u.) bereitgestellt werden.

Es war lange umstritten, ob die Speicheldrüsen in *Drosophila*, wie ursprünglich vermutet (110-113), nach der Pupariumbildung in Histolyse eintreten, oder ob in diesem Stadium die Synthese eines wie auch immer gearteten, neuen Sekrets beginnt (87, 88). Aufgrund der hier vorgelegten Ergebnisse darf Letzteres als endgültig bewiesen gelten. Dabei ergänzen sich die auf verschiedenen Ebenen erhobenen Befunde:

1) Chromosomale Ebene: Die insgesamt sehr hohe Aktivität der Puffs auch während der Pupariumbildung bis zum Zeitpunkt der Puppenhäutung (16, 114-117) spricht für die weiterhin hohe Stoffwechselaktivität der Zellen und gegen beginnende Degeneration. Die Tatsache, daß bei *D. virilis* in dem Zeitraum der Pupariumbildung Loci, die vorher aktiv waren, inaktiv werden, während andere Gene erstmals aktiviert werden (16), spricht außerdem dafür, daß vor und nach diesem Zeitpunkt unterschiedliche Proteinsynthese-Programme ablaufen.

2) Zellebene: Das Zytoplasma zeigt im Elektronenmikroskop während des gesamten Vorpuppenstadiums bei *D.*

melanogaster keine Autolyse-Erscheinungen; Ergastoplasma, Golgifelder und Mitochondrien erscheinen voll funktionsfähig (87). Eine Substanz, die schwache (113, 118) bzw. gar keine PAS-Färbung (23, 87) zeigt, sammelt sich in Vakuolen (1 h nach Pupariumbildung bei *D. melanogaster* -(87)-) und wird ins Drüsenlumen abgegeben (87, vgl. auch die Beobachtungen von Kress und Enghofer bei *D. virilis*, 28). Diese Vakuolen unterscheiden sich bei *D. melanogaster* deutlich von den während des III. Larvenstadiums gebildeten Sekretgrana.

3) Ebene der Enzyme und Metabolite: Die aufgrund isolierter Betrachtung der Aminotransferase früher geäußerte Ansicht (28), die Mucopolysaccharid-Synthese würde gleichzeitig mit dem Aktivitätensende dieses Enzyms, also zum Zeitpunkt der Pupariumbildung beendet sein, muß revidiert werden. Zwar berechtigt der Befund, daß die Aminotransferase zum selben Zeitpunkt inaktiv wird, an dem die Synthese des larvalen Mucoproteins beendet ist (22, 119) zu der Auffassung, daß sie eine Schlüsselrolle in der Synthese des larvalen Sekrets hat; aber die GM-P-Isomerase kann von diesem Zeitpunkt an die GM-6-P-Synthese, zu der sie vorher allenfalls einen ergänzenden Beitrag geleistet hat, alleine übernehmen. GM-6-P würde durch die weiterhin auf hohem Niveau aktive N-Acetylase (Abb. 12) sofort metabolisiert. Damit ist von der Enzymausstattung her die Voraussetzung für die Bildung eines Sekrets auch in der Vorpuppe gegeben.

Der Verlauf des Einbaus radioaktiver Substrate ebenso wie der zunächst fallende und dann wieder ansteigende Spiegel der UDPNAcHexosamine (Abb. 20) zeigt deutlich, daß vor der Pupariumbildung ein bis dahin ablaufendes Syntheseprogramm erlischt, und unmittelbar danach die Synthese eines wahrscheinlich andersartigen Sekrets beginnt. Es ist besonders interessant, daß dieser Syntheseweg sich auch in der ersten seiner Reaktionen von dem vorher beschrifteten unterscheidet.

4) Ebene der Sekretproteine: Sowohl die Proteinfärbung als auch der spezifische Einbau von ^3H -Glucose in die Sekretproteine erbrachten den endgültigen Nachweis, daß in *Drosophila* ein "Vorpuppensekret" gebildet wird, das anders zusammengesetzt ist als das larvale Sekret. Damit steht im Einklang, daß nach Injektion von ^3H -Aminosäuren (86) oder ^{14}C -NacGM (23) in Larven und Vorpuppen von *D. melanogaster* jeweils unterschiedliche Sekret-Proteinfraktionen radioaktiv markiert werden.

E) ZUSAMMENFASSUNG*

1) Der Stoffwechsel des Glucosamins wurde in homogenisierten sowie intakten Speicheldrüsen von *Drosophila virilis* charakterisiert und seine entwicklungsbedingten Veränderungen untersucht. Wegen der geringen Menge an Drüsenmaterial waren umfangreiche methodische Vorarbeiten nötig.

2) Durch die Kombination radioaktiver Markierung mit säulenchromatographischen Methoden und verschiedenen Dünnschichtverfahren konnten alle (insgesamt 12) interessierenden Aminosukcerderivate, Uridinnucleotide und Zuckerphosphate aus Mikroansätzen (ca. 300 µg Protein) aufgetrennt und quantitativ erfaßt werden. Die Methode wurde durch Vergleich der Synthese von Glucosamin-6-Phosphat in Speicheldrüsenhomogenaten unter verschiedenen Bedingungen bei a) colorimetrischer Messung des Produktes und b) Isolierung des radioaktiv markierten Produktes geprüft.

3) Drei Enzyme des Glucosamin-Stoffwechsels wurden in Homogenatüberständen von Speicheldrüsen kinetisch und ontogenetisch charakterisiert. Kinetik:

Aminotransferase: pH-Optimum: 6.8; K_m (F-6-P) = 1.1 mM und K_m (Glu-NH₂) = 0.25 mM. Das Enzym wird durch Glu-NH₂ (in Konzentrationen ab 1 mM) gehemmt und unterliegt einer Feedback-Kontrolle durch UDPNAcGM.

GM-P-Isomerase: pH-Optimum: 6.6 und in Gegenwart von G-6-P 7.4; K_m (F-6-P) = 10 mM und K_m (NH₄⁺) = 6.9 mM. Das Enzym wird durch G-6-P und NAcGM-6-P aktiviert, wobei sich seine Affinität gegenüber beiden Substraten erhöht. Die K_m -Werte erniedrigen sich bei Anwesenheit von 20 mM G-6-P auf 3.4 mM für F-6-P und 3.7 mM für NH₄⁺.

N-Acetylase: pH-Optimum: 6.5; K_m (GM-6-P) = 2.05 mM. Die Isotopenmarkierung erlaubte einen indirekten Schluß auf die Anwesenheit der NAcGM-Phosphomutase in der löslichen Homogenatfraktion. UDPNAcGM-Pyrophosphorylase wur-

* Abkürzungen siehe zu Beginn der Arbeit.

de in vitro allerdings nicht nachgewiesen.

4) Ontogenie der Enzyme: Die Aminotransferase ist 140 h nach Eiablage (wenn die Larven das Futter verlassen) maximal aktiv und wird in den folgenden 11 Stunden bis zur Pupariumbildung inaktiviert. Ihre Aktivität ist eng mit der Synthese larvalen Sekrets korreliert. Durch Injektion von Ecdyson 10-13 h vor der endogenen Hormonausschüttung wird die Aktivität des Enzyms auf 10 % der Kontrolltiere reduziert.

Die GM-P-Isomerase zeigt vor der Pupariumbildung wie innerhalb 10 h danach gleichmäßig ansteigende Aktivität. Die N-Acetylase, deren Aktivität nur in einem kurzen Zwischenstadium (140-156 h nach Eiablage) verringert ist, hält den GM-6-P-Spiegel durchwegs auf einem extrem niedrigen Niveau.

5) Durch Vergleich der Proteinsyntheseraten mittels Einbau von ^3H -Leucin wurde das von Poels (37) angegebene Medium, mit einer geringfügigen Modifikation, als das bestgeeignete Kulturmedium für Versuche mit intakten, explantierten Speicheldrüsen ermittelt.

6) In intakten Speicheldrüsen wird nach Inkubation in Poels-Medium mit ^3H -Glucose und ^{14}C -Uridin bzw. ^{14}C -Glucosamin ein Einbau von Radioaktivität in alle Metabolite der Reaktionssequenz (GM-6-P, NAcGM-6-P und -1-P, UDPNAcGM und UDPNAcGALM) gefunden. ^{14}C -Glucose und ^{14}C -Glucosamin werden auch in die Endprodukte des Stoffwechsels, die Sekretproteine, eingebaut. In dem von ^3H -Glucose zu den UDPNAcHexosaminen führenden Stoffwechselweg wird Sättigung der Pools nach 20-45 min gefunden; in dem von ^{14}C -Uridin zu UTP führenden Weg wird Sättigung erst nach ca. 45 (UMP) bis über 90 min (UTP) erreicht. Da die UDPHexosen ebenfalls markiert werden, wird angenommen, daß in den Drüsen auch Glycogen synthetisiert wird.

7) Der Einbau von Radioaktivität in die meisten Intermediär- und in die Endprodukte ist am stärksten in Larven, die das Futter verlassen (140 h nach Eiablage).

Er nimmt innerhalb der 11 Stunden bis zur Pupariumbildung ab, am deutlichsten in der Fraktion der UDP-NAcHexosamine, und folgt damit dem Aktivitätsverlauf der Aminotransferase. In den ersten 5-10 h nach der Pupariumbildung nimmt der Substrateinbau in die UDP-NAcHexosamine wieder zu; verantwortlich für den erneuten ^3H -Glucose-Einbau ist jetzt die Aktivität der GM-P-Isomerase. Der endogene Pool der UDPNAcHexosamine nimmt einen analogen Verlauf. Für diese Stoffwechseleränderungen kommt neben den genannten Enzymen auch eine Regulation der UDPNAcGM-Pyrophosphorylase in Frage, da sowohl der Einbau von Uridin in die UDP-NAcHexosamine wie auch derjenige von Glucosamin, beides unabhängig von der Aktivität der die GM-6-P-Synthese katalysierenden Enzyme, ebenfalls zurückgeht.

8) Die erneute Zunahme des Einbaus von Radioaktivität in die Metabolite nach der Pupariumbildung kommt auch in der Markierung von Sekretproteinen zum Ausdruck. Im Vergleich zum larvalen Sekret werden unterschiedliche Proteinfractionen markiert. Daraus kann auf die Existenz eines spezifischen, Glucosamin enthaltenden "Vorpuppensekrets" geschlossen werden.

LITERATUR

- (1) Kafatos, F.C.: The cocoonase zymogen cells of silk moths: a model of terminal cell differentiation for specific protein synthesis. In: Current Topics in Developmental Biology (Hrsg. A.A. Moscona, A. Monroy), Vol. 7. New York: Academic Press 1972.
- (2) Palmiter, R.D.: Rate of ovalbumin messenger ribonucleic acid synthesis in the oviduct of estrogen-primed chicks. J. Biol. Chem. 248, 8260-8270 (1973).
- (3) Gurdon, J.B., Woodland, H.R., Lingrel, J.B.: The translation of mammalian globin mRNA injected into fertilized eggs of *Xenopus laevis*. Dev. Biol. 39, 125-133 (1974).
- (4) Brawerman, G.: Eukaryotic messenger RNA. In: Ann. Rev. Biochem. 43, 621-642 (1974).
- (5) Bester, A.J., Kennedy, D.S., Heywood, S.M.: Two classes of translational control RNA: Their role in the regulation of protein synthesis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 1523-1527 (1975).
- (6) Heywood, S.M., Kennedy, D.S., Bester, A.J.: Studies concerning the mechanism by which translational-control RNA regulates protein synthesis in embryonic muscle. Eur. J. Biochem. 58, 587-593 (1975).
- (7) Heywood, S.M.: Specificity of mRNA binding factor in eukaryotes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67, 1782-1788 (1970).
- (8) Wigle, D.T.: Purification of a messenger-specific initiation factor from ascites-cell supernatant. Eur. J. Biochem. 35, 11-17 (1973).
- (9) Nudel, V., Lebleu, B., Revel, M.: Discrimination between messenger ribonucleic acids by a mammalian translation initiation factor. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2139-2144 (1973).
- (10) Heywood, S.M., Kennedy, D.S., Bester, A.J.: Separation of specific initiation factors involved in the translation of myosin and myoglobin messenger RNAs and the isolation of a new RNA involved in translation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 2428-2431 (1974).
- (11) Palmiter, R.D., Moore, P.B., Mulvihill, E.R.: A significant lag in the induction of ovalbumin messenger RNA by steroid hormones: a receptor translocation hypothesis. Cell, Vol. 8, 557-572 (1976).
- (12) Pelling, C.: Ribonukleinsäure-synthese der Riesen-chromosomen. Autoradiographische Untersuchungen an *Chironomus tentans*. Chromosoma (Berl.) 15, 71-122 (1955).
- (13) Kaufmann, B.P., McDonald, M., Gay, H.: Enzymatic degradation of ribonucleoproteins of chromosomes, nucleoli and cytoplasm. Nature 162, 814-815 (1948).
- (14) Breuer, M.E., Pavan, C.: Behavior of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. Chromosoma (Berl.) 7, 371-381 (1955).
- (15) Brachet, J.: Biochemical cytology. Academic Press, New York, p. 120f. (1957).
- (16) Kress, H.: Das Puffmuster der Riesenchromosomen in den larvalen Speicheldrüsen von *Drosophila virilis*: seine Veränderungen in der Normalentwicklung und nach Injektion von Ecdyson. S.-B.-Bayer. Akad. Wiss., Math.-Naturw. Kl., 129-149 (1972).

- (17) Beermann, W.: Cytologische Aspekte der Informationsübertragung von den Chromosomen in das Cytoplasma. In: Induktion und Morphogenese. Springer, Heidelberg (1963).
- (18) Baudisch, W., Panitz, R.: Kontrolle eines biochemischen Merkmals in den Speicheldrüsen von *Acrisotopus lucidus* durch einen Balbiani-Ring. Exp. Cell. Res. 49, 470-476 (1968).
- (19) Beermann, W.: Ein Balbiani-Ring als Locus einer Speicheldrüsenmutation. Chromosoma (Berl.) 12, 1-25 (1961).
- (20) Grossbach, U.: Chromosomen-Aktivität und biochemische Zelldifferenzierung in den Speicheldrüsen von *Camptochironomus*. Chromosoma (Berl.) 28, 136-187 (1969).
- (21) Grossbach, U.: Chromosome puffs and gene expression in polytene cells. Cold Spring Harbor Symp. XXXVIII, 619-627 (1973).
- (22) Korge, G.: Chromosome puff activity and protein synthesis in larval salivary glands of *Drosophila melanogaster*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 4550-4554 (1975).
- (23) Korge, G.: Larval saliva in *Drosophila melanogaster*: Production, composition, and relationship to chromosome puffs. Dev. Biol., in Druck (1977).
- (24) Kodani, M.: The protein of the salivary gland secretion in *Drosophila*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 34, 131-135 (1948).
- (25) Perkowska, E.: Some characteristics of the salivary gland secretion of *Drosophila virilis*. Exp. Cell Res. 32, 259-271 (1963).
- (26) Ashburner, M.: Functions and structure of polytene chromosomes during insect development. Advanc. Ins. Physiol. 7, 1-95 (1970).
- (27) Kress, H.: Specific repression of a puff in the salivary gland chromosomes of *Drosophila virilis* after injection of glucosamine. Chromosoma (Berl.) 40, 379-386 (1973).
- (28) Kress, H., Enghofer, E.: Kinetic characteristics and ontogeny of glutamine-fructose-6-phosphate-aminotransferase in *Drosophila* salivary glands. Insect Biochem. 5, 171-181 (1975).
- (29) Kress, H.: Korrelation zwischen Puffaktivität und Sekretsynthese in den larvalen Speicheldrüsen von *Drosophila virilis*. Sonderdruck aus Verh. Dtsch. Zool. Ges. (1975).
- (30) Kress, H.: Temporal relationships between leaving food, ecdysone release, mucoprotein extrusion and puparium formation in *Drosophila virilis*. J. Insect Physiol., 20, 1041-1055 (1974).
- (31) Distler, J.J., Merrick, J.M., Roseman, S.: Glucosamine metabolism - III. Preparation and N-acetylation of crystalline D-glucosamine- and D-galactosamine-6-phosphoric acids. J. Biol. Chem. 230, 497-509 (1958).

- (72) Sela, B., Lis, H., Sachs, L.: Enzymatic hydrolysis of uridine diphosphate-N-acetyl-D-galactosamine and uridine diphosphate-N-acetyl-D-glucosamine by normal cells, and blocks in this hydrolysis in transformed cells and their revertants. *J. Biol. Chem.* 247, 7585-7590 (1972).
- (73) Lowry, O.H., Passonneau, J.V.: A flexible system of enzymatic analysis. Academic Press, New York (1972).
- (74) Enghofer, E.: Nachweis und Charakterisierung der Glutamin-Fructose-6-Phosphat-Transaminase in *Drosophila virilis*. Staatsexamensarbeit (1974).
- (75) Levvy, G.A., McAllan, A.: A colorimetric method for the determination of N-acetylglucosamine and N-acetylchondrosamine. *Biochem. J.* 28, 988-995 (1959).
- (76) Leloir, L.F., Cardini, C.E.: Enzymes acting on glucosamine phosphates. *Biochim. Biophys. Acta* 20, 33-42 (1956).
- (77) Poels, C.L.M.: Mucopolysaccharide secretion from *Drosophila* salivary gland cells as a consequence of hormone induced gene activity. *Cell Differentiation* 1, 63-78 (1972).
- (78) Cohn, W.E.: The anion-exchange separation of ribonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* 72, 1471-1478 (1950).
- (79) Hurlbert, R.B., Schmitz, H., Brumm, A.F., Potter, R. van: Nucleotide metabolism - II. Chromatographic separation of acid-soluble nucleotides. *J. Biol. Chem.* 209, 23-39 (1954).
- (80) Schnitzger, H., Papenberg, K., Ganse, E., Czok, R., Bücher, Th., Adam, H.: Chromatographie phosphathaltiger Metabolite eines menschlichen Leberpunktats. *Biochem. Z.* 332, 167-185 (1959).
- (81) Heldt, H.W.: Phosphathaltige Metabolite in Anionenaustauschchromatogrammen säurelöslicher Extrakte aus Rattenleber im Nano-Bereich. *Biochem. Z.* 337, 397-413 (1963).
- (82) Stahl, E. (Hrsg.): Dünnschichtchromatographie. Springer, Berlin (1967).
- (83) Roberts, R.M.: The incorporation of D-glucosamine-¹⁴C into root tissues of higher plants. *Plant Physiol.* 45, 263-267 (1970).
- (84) Simon, H. (Hrsg.): Anwendung von Isotopen in der Organischen Chemie und Biochemie, Band II: Messung von radioaktiven und stabilen Isotopen. Springer, Berlin (1974).
- (85) Hanes, C.S., Isherwood, F.A.: Separation of the phosphoric esters on the filter paper chromatogram. *Nature* 164, 1107-1112 (1949).
- (86) Randerath, K., Randerath, E.: Ion-exchange thin-layer chromatography - XIV. Separation of nucleotide sugars and nucleoside monophosphates on PEI-cellulose. *Anal. Biochem.* 13, 575-579 (1965).
- (87) Grassetti, D.R., Murray, J.F., Wellings, J.L.: Thin-layer chromatography of phosphorylated glycolysis intermediates. *J. Chromatog.* 18, 612-614 (1965).
- (88) Hrabák, A.: Separation of amino sugars and amino acids in glycoproteins and biological fluids on resin-coated chromatoplates. *J. Chromatog.* 84, 204-207 (1973).

- (49) Matthias, W.: Serienuntersuchungen mit Hilfe einer neuen Form der Streifen-Papierchromatographie. *Naturwiss.* 41, 17-18 (1954).
- (50) Marzullo, G., Lash, J.W.: Separation of phosphorylated and UDP derivatives of hexosamines and acetyl-hexosamines by TLC. *Anal. Biochem.* 18, 579-582 (1967).
- (51) Dijk, J., Brouwer, M., Coert, A., Gruber, M.: Structure and function of hemocyanins. VII. The smallest subunit of α - and β -hemocyanin of *Helix pomatia*: Size, composition, N- and C-terminal amino acids. *Biochim. Biophys. Acta* 221, 467-479 (1970).
- (52) Hughes, R.C.: Membrane glycoproteins. Butterworths, London (1976).
- (53) Paladini, A.C., Leloir, L.F.: Studies on uridine-diphosphate-glucose. *Biochem. J.* 51, 426-430 (1952).
- (54) Carey, F.G., Wyatt, G.R.: Uridine diphosphate derivatives in the tissues and hemolymph of insects. *Biochim. Biophys. Acta* 41, 178-179 (1960).
- (55) Benson, R.L., Friedman, S.: Allosteric control of glucosamine phosphate isomerase from the adult housefly and its role in the synthesis of glucosamine 6-phosphate. *J. Biol. Chem.* 245, 2219-2228 (1970).
- (56) Dietrich, C.P., Dietrich, S.M.C., Pontis, H.G.: Separation of sugar phosphates and sugar nucleotides by thin-layer chromatography. *J. Chromatog.* 15, 277-278 (1964).
- (57) Reissig, J.L.: Phosphoacetylglucosamine mutase of *Neurospora*. *J. Biol. Chem.* 219, 753-767 (1956).
- (58) Kress, H.: Transcriptional control of developmental processes by ecdysone in *Drosophila virilis* salivary glands. *Wilhelm Roux's Archives*, in Druck (1977).
- (59) Leloir, L.F., Cardini, C.E.: The biosynthesis of glucosamine. *Biochim. Biophys. Acta* 12, 15-22 (1953).
- (60) Brown, D.: The D-glucosamine-6-phosphate N-acetylase of yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 16, 429-431 (1955).
- (61) Davidson, E.A., Blumenthal, H.J., Roseman, S.: Glucosamine metabolism. II. Studies on glucosamine 6-phosphate N-acetylase. *J. Biol. Chem.* 226, 125-133 (1957).
- (62) Comb, D.G., Roseman, S.: Glucosamine metabolism. IV. Glucosamine-6-phosphate deaminase. *J. Biol. Chem.* 232, 807-827 (1958).
- (63) Kornfeld, S., Kornfeld, R., Neufeld, E.F., O'Brien, P.J.: The feedback control of sugar nucleotide biosynthesis in liver. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 52, 371-379 (1964).
- (64) Kornfeld, R.: Studies on L-glutamine D-fructose-6-phosphate amidotransferase. I. Feedback inhibition by uridine diphosphate-N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* 242, 3135-3141 (1967).
- (65) Ohta, N., Pardee, A.B., McAuslan, B.R., Burger, M.M.: Sialic acid contents and controls of normal and malignant cells. *Biochim. Biophys. Acta* 158, 98-102 (1968).
- (66) Danishefsky, I., Deutsch, L.: Glucosamine synthesis in mast cells. *Biochim. Biophys. Acta* 151, 529-531 (1968).
- (67) Kikuchi, H., Kobayashi, Y., Tsuiki, S.: L-glutamine: D-fructose-6-phosphate amidotransferase in tumors and the liver of tumor-bearing animals. *Biochim. Biophys. Acta* 237, 412-421 (1971).

- (68) Miyagi, T., Tsuiki, S.: Effect of phosphoglucose isomerase and glucose-6-phosphate on UDP-N-acetylglucosamine inhibition of L-glutamine: D-fructose-6-phosphate aminotransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 250, 51-62 (1971).
- (69) Winterburn, P.J., Phelps, C.F.: Studies on the control of hexosamine biosynthesis by glucosamine synthetase. *Biochem. J.* 121, 711-720 (1971).
- (70) Trujillo, J.L., Horng, W.J., Gan, J.C.: Glycoprotein synthesis. IV. Activities of enzymes involved in glucosamine metabolism in the bovine thyroid gland. *Biochim. Biophys. Acta* 252, 443-452 (1971).
- (71) Speck, U., Urich, K., Herz-Hübner, U.: Nachweis einer Regulation der Glucosaminbildung bei dem Flußkrebs *Orconectes limosus* zur Zeit der Häutung. *Z. vergl. Physiol.* 76, 341-346 (1972).
- (72) Bates, C.J., Handschumacher, R.E.: Inactivation and resynthesis of glucosamine-6-phosphate synthetase after treatment with glutamine analogs. *Adv. Enzyme Regulation* 7, 183-204 (1969).
- (73) Mazlen, R.G., Muellenberg, C.G., O'Brien, P.J.: Control of L-glutamine-D-fructose-6-phosphate amidotransferase in bovine retina. *Biochim. Biophys. Acta* 171, 352-354 (1969).
- (74) Ellis, D.B., Sommar, K.M.: Regulation of L-glutamine: D-fructose-6-phosphate aminotransferase activity in bovine trachea. *Biochim. Biophys. Acta* 230, 531-534 (1971).
- (75) Benson, R.L.: Assay for 2-amino-2-deoxy-D-glucose in the presence of other primary amines. *Carbohydrate Research* 42, 192-196 (1975).
- (76) Heyns, K., Koch, W.: Über die Bildung eines Aminoazuckers aus d-Fructose und Ammoniak. *Z. Naturforschg.* 7b, 486-488 (1952).
- (77) Illmensee, K.: *Pers. Mitteilg.* (1974).
- (78) Izumi, K.: Intracellular distribution of enzymes involved in glucosamine metabolism in rat liver. *J. Biochem. (Tokyo)* 57, 539-546 (1965).
- (79) Kohn, P., Winzler, R.J., Hoffmann, R.C.: Metabolism of D-glucosamine and N-acetyl-D-glucosamine in the intact rat. *J. Biol. Chem.* 237, 304-308 (1962).
- (80) Fristrom, J.W.: Hexosamine metabolism in imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 14, 729-740 (1968).
- (81) Trujillo, J.L., Gan, J.C.: Glycoprotein biosynthesis. III. Pool sizes of glucosamine intermediates in the bovine thyroid gland. *Biochim. Biophys. Acta* 286, 330-338 (1972).
- (82) Stoffyn, P.J., Jeanloz, R.W.: Identification of amino sugars by paper chromatography. *Arch. Biochem.* 52, 373-379 (1954).
- (83) McGarrahan, J.F., Maley, F.: Hexosamine metabolism. I. The metabolism in vivo and in vitro of D-glucosamine-1-C¹⁴ and N-acetyl-D-glucosamine-1-C¹⁴ in rat liver. *J. Biol. Chem.* 237, 2458-2465 (1962).
- (84) Roberts, R.M., Heishman, A., Wicklin, C.: Growth inhibition and metabolite pool levels in plant tissues fed D-glucosamine and D-galactose. *Plant Physiol.* 48, 36-42 (1971).

- (85) Fraenkel, G.: A function of the salivary glands of the larvae of *Drosophila* and other flies. *Biol. Bull.* 103, 285-286 (1952).
- (86) Beckendorf, S.K., Kafatos, F.C.: Differentiation in the salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Characterization of the glue proteins and their developmental appearance. *Cell* 9, 365-373 (1976).
- (87) Gaudecker, B. von: Der Strukturwandel der larvalen Speicheldrüse von *Drosophila melanogaster*. *Z. Zellforsch.* 127, 50-86 (1972).
- (88) Gaudecker, B. von: Histochemical investigation on the salivary gland in the prepupal instar period of *Drosophila melanogaster*. Abstracts from the 3rd Europ. *Drosophila* res. conf., Milano (1972).
- (89) Mayer, F.C., Bikel, I., Hassid, W.Z.: Pathway of uridine diphosphate N-acetyl-D-glucosamine biosynthesis in *Phaseolus aureus*. *Plant Physiol.* 43, 1097-1107 (1968).
- (90) Warren, L.: The biosynthesis and metabolism of amino sugars and amino sugar-containing heterosaccharides. In: Gottschalk, A. (Editor): *Glycoproteins - their composition, structure and function*, part B, Elsevier, Amsterdam, 1097-1126 (1972).
- (91) Davidson, E.A.: Metabolism of amino sugars. In: Balazs, E.A., Jeanloz, R.W. (Editors): *The aminosugars*, Vol. 2B, Academic Press, New York, 1-45 (1966).
- (92) White, R.J., Pasternak, C.A.: The purification and properties of N-acetylglucosamine 6-phosphate deacetylase from *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 105, 121-125 (1967).
- (93) Clarke, J.S., Pasternak, C.A.: The regulation of amino sugar metabolism in *Bacillus subtilis*. *Biochem. J.* 84, 185-191 (1962).
- (94) Bates, C.J., Pasternak, C.A.: Further studies on the regulation of amino sugar metabolism in *Bacillus subtilis*. *Biochem. J.* 96, 147-154 (1965).
- (95) Benson, R.L.: Ph. D. thesis, University of Illinois, (1969).
- (96) Pattabiraman, T.N., Bachhawat, B.K.: Purification of glucosamine 6-phosphate deaminase from human brain. *Biochim. Biophys. Acta* 54, 273-283 (1961).
- (97) Rowe, W.B., Ronzio, R.A., Wellner, V.P., Meister, A.: Glutamine synthetase (sheep brain). In: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Editors): *Methods in Enzymology*, Vol. XVII, Academic Press, New York, 900-910 (1970).
- (98) Pattabiraman, T.N., Bachhawat, B.K.: Purification of glucosamine-6-phosphate N-acetylase from sheep brain. *Biochim. Biophys. Acta* 59, 681-689 (1962).
- (99) Smith, E.E.B., Munch-Petersen, A., Mills, G.T.: Pyrophosphorolysis of uridine diphospho glucose and "UDPX" by a rat liver nuclear fraction. *Nature* 172, 1038-1039 (1953).
- (100) Smith, E.E.B., Mills, G.T.: Uridine nucleotide compounds of liver. *Biochim. Biophys. Acta* 13, 386-400 (1954).
- (101) Phelps, C.F., Hardingham, T.E., Winterburn, P.J.: Studies on the control of nucleotide sugar metabolism in glucosaminoglycan biosynthesis. *Exposés Annuels de Biochimie Médicale* 79-95 (1970).

- (102) Bates, C.J., Adams, W.R., Handschumacher, R.E.: Control of formation of uridine diphosphate N-acetylhexosamine and glycoprotein synthesis in rat liver. *J. Biol. Chem.* 241, 1705-1712 (1966).
- (103) Winterburn, P.J., Phelps, C.F.: Purification and some kinetic properties of rat liver glucosamine synthetase. *Biochem. J.* 121, 701-709 (1971).
- (104) Glaser, L.: The biosynthesis of N-acetylgalactosamine. *J. Biol. Chem.* 234, 2801-2805 (1959).
- (105) Jacobson, B., Davidson, E.A.: UDP-D-glucuronic acid-5-epimerase and UDP-N-acetylglucosamine - 4-epimerase of rabbit skin. *Biochim. Biophys. Acta* 73, 145-151 (1963).
- (106) Leloir, L.F.: The enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into a galactose derivative. *Arch. Biochem. Biophys.* 33, 186-190 (1951).
- (107) Gwinn, J.F., Stevenson, J.R.: Role of acetylglucosamine in chitin synthesis in crayfish - II. Enzymes in the epidermis for incorporation of acetylglucosamine into UDP-acetylglucosamine. *Comp. Biochem. Physiol.* 45B, 777-785 (1973).
- (108) Hagn, B.: Eigenschaften von Hexokinase und Phosphofructokinase in den larvalen Speicheldrüsen von *D. virilis*. Staatsexamensarbeit (1975).
- (109) Trujillo, J.L., Gan, J.C.: Glycoprotein biosynthesis. VI. Regulation of uridine diphosphate N-acetyl-D-glucosamine metabolism in bovine thyroid gland slices. *Biochim. Biophys. Acta* 304, 32-41 (1973).
- (110) Ross, E.B.: The post-embryonic development of the salivary glands of *Drosophila melanogaster*. *J. Morph.* 65, 471-496 (1939).
- (111) Bodenstein, D.: Factors influencing growth and metamorphosis of the salivary gland in *Drosophila*. *Biol. Bull.* 84, 13-33 (1943).
- (112) Bodenstein, D.: The postembryonic development of *Drosophila*. *Biology of Drosophila* (ed. by Demerec, M.). Hafner Publishing Comp., New York, 275-367 (1950).
- (113) Leshner, S.: Studies on the larval salivary gland of *Drosophila*. III. The histochemical localization and possible significance of ribonucleic acid, alkaline phosphatase and polysaccharide. *Anat. Rec.* 114, 633-635 (1953).
- (114) Becker, H.J.: Die Puffs der Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster*. I. Mitteilung: Beobachtungen zum Verhalten des Puffmusters im Normalstamm und bei zwei Mutanten, Giant und Lethal-Giant-Larvae. *Chromosoma (Berl.)* 10, 654-678 (1959).
- (115) Becker, H.J.: Die Puffs der Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster*, II. Mitteilung: Die Auslösung der Puffbildung, ihre Spezifität und ihre Beziehung zur Funktion der Ringdrüse. *Chromosoma (Berl.)* 13, 341-384 (1962).

- (116) Berendes, H.D.: Salivary gland function and chromosomal puffing patterns in *Drosophila hydei*. *Chromosoma* (Berl.) 17, 35-77 (1965).
- (117) Ashburner, M.: Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. I. Autosomal puffing patterns in a laboratory stock of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* (Berl.) 21, 398-428 (1967).
- (118) Gaudecker, B. von, Schmale, E.M.: Substrate histochemical investigations and ultrahistochemical demonstrations of acid phosphatase in larval and prepupal salivary glands of *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res.* 155, 75-89 (1974).
- (119) Poels, C.L.M., de Loof, A., Berendes, H.D.: Functional and structural changes in *Drosophila* salivary gland cells triggered by ecdysterone. *J. Insect Physiol.* 17, 1717-1729 (1971).

Lebenslauf

15. Feb. 1949 Geboren als einziges Kind der Eheleute
Toni und Marianne Enghofer in Altötting,
wo die Eltern bis vor sieben Jahren eine
Tankstelle und Fahrschule führten.
- Sept. 55-Juli 59 Besuch der Volksschule in Altötting.
- Sept. 1959 Eintritt in das mathematisch-naturwis-
senschaftliche Gymnasium am Staatlichen
Landschulheim Marquartstein.
- Dez. 64-April 65 Besuch der englischen Partnerschule
"Rugby School".
- Juli 1968 Abitur, Einschreibung an der Universität
München für Biologie, Chemie und Sport.
- WS 1968-SS 1969 Ganztagsstudium an der Sporthochschule
München, Grünwald.
- WS 1969 Beginn des Fachstudiums Biologie/Chemie;
vom 2. bis 6. Fachsemester wissenschaft-
liche Hilfskraft bei Prof. Dr. Renner.
- SS 1971 Vordiplomprüfung.
- WS 1972-WS 1973 Staatsexamens- und Diplomarbeit im Fach
Zoologie.
- März 1974 Diplomprüfung.
- April 1974 Heirat.
- Beginn der vorliegenden Promotionsarbeit.

